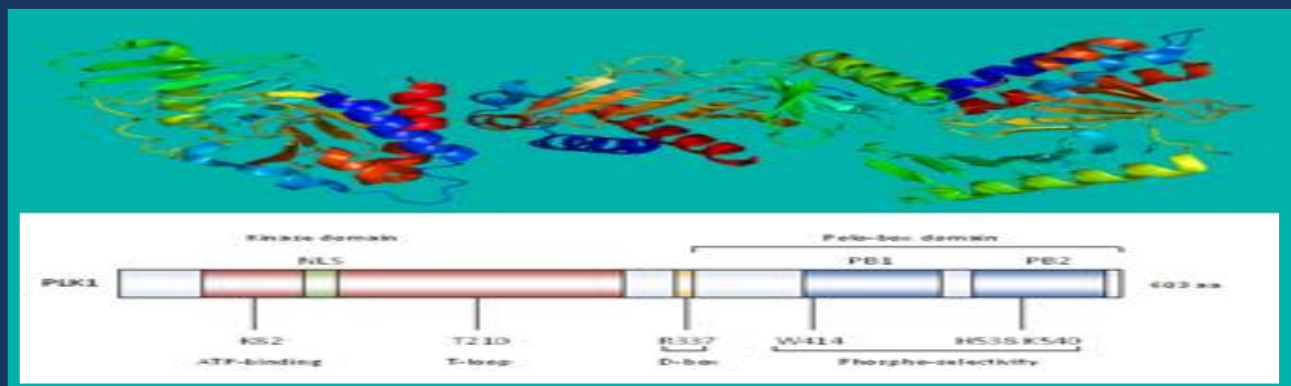
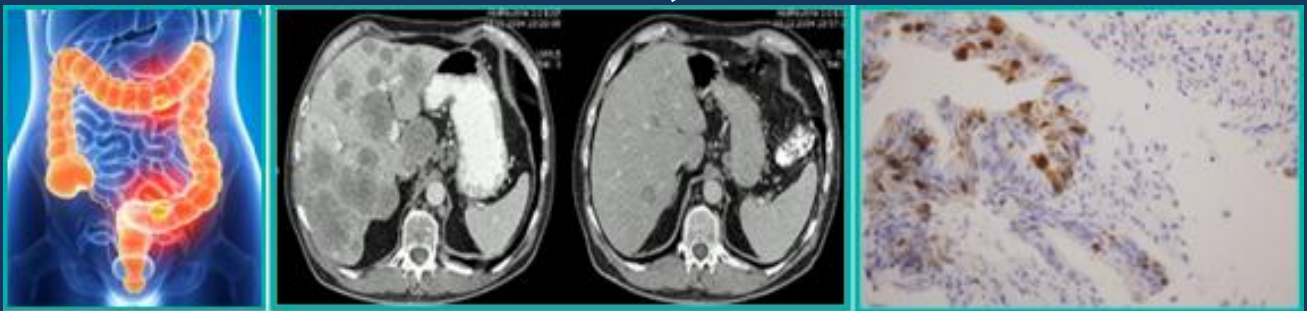


## Tesis Doctoral

Análisis de la expresión de PLK1 como factor pronóstico y predictor de respuesta a tratamiento quimioterápico en carcinoma colo-rectal metastásico

**Delia Cortés Guiral**  
**Madrid, 2017**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Faculta de Medicina

Departamento de Cirugía

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PLK1 COMO  
FACTOR PRONÓSTICO Y PREDICTOR DE  
RESPUESTA A TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO EN  
CARCINOMA COLO-RECTAL METASTÁSICO**

TESIS DOCTORAL

DELIA CORTÉS GUIRAL

Madrid, 2017

# **ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PLK1 COMO FACTOR PRONÓSTICO Y PREDICTOR DE RESPUESTA A TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO EN CARCINOMA COLO-RECTAL METASTÁSICO**

Trabajo presentado por

**DELIA CORTÉS GUIRAL**

Para optar al título de Doctor en Medicina en el Departamento de  
Cirugía de la Universidad Autónoma de Madrid

Dirigido por el Profesor Doctor

**D. CARLOS PASTOR IDOATE**

Y por la Profesora Doctora

**D<sup>a</sup>. MARÍA JESÚS FERNÁNDEZ ACEÑERO**

Departamento de Cirugía

Universidad Autónoma de Madrid

Febrero 2017

“No intentes cambiar las cosas luchando contra la realidad actual.  
Para cambiar algo, crea un nuevo modelo que deje obsoleto el  
modelo existente”

Buckminster Fuller

A Edu

## Agradecimientos

Gracias a todos por vuestro apoyo y consejos en estos años de trabajo.

Gracias al Dr. Pastor por confiar en mí para desarrollar esta tesis, por su trabajo de dirección y por lo mucho que me ha enseñado sobre cáncer colo-rectal y sobre la vida en estos años.

Gracias a la Dra. Fernández Aceñero por su infatigable trabajo, por su ejemplo, por su constante dedicación y su infinita paciencia y cariño.

A los dos, a mis directores, gracias por no dejarme desfallecer, por ayudarme a completar el trabajo y por vuestro apoyo en este momento. Desde el fondo de mi corazón, siempre os estaré inmensamente agradecida.

Gracias a mi hijo; Edu, por ti quiero ser cada día mejor, por ti no hay cansancio, ni tristeza. Por ti hay alegría, grandes metas, ilusiones y sueños. Este trabajo, todo mi trabajo y todo lo bueno de mi es para ti.

A mis padres por haber estado, porque están y porque estarán siempre. Gracias por vuestro apoyo y amor infinitos. A Pablo.

Gracias a toda mi familia. A Eduardo por su tiempo.

Gracias a todos mis compañeros del Servicio de Cirugía General de la Fundación Jiménez Díaz. A todos. Porque cada día me ayudáis a ser mejor. A Alfredo Badía y a Ismael Guijo gracias por las horas que habéis dedicado a enseñarme con tanta perseverancia. Gracias al Dr. García-Olmo por su apoyo en este proyecto, por su ánimo y su ejemplo. A Peter, Mario, Santi, María, Ángel, Enriqueta, Sonia, Héctor, Loles, Gabi, Joaquín, Mariano, Marilú, Adela, Rafa, Patri, Carla, Irene, Joserra, Javi, Miguel Ángel, Pilar, Arsenio. A nuestros ángeles enfermer@s de la planta y de quirófano.

A mis grandes amigos, los mejores, los que han empujado conmigo, a Elisa y Guille, a Eva, Charlie y Noa, a Arantxa, a María S.

Gracias a todos por vuestro apoyo y consejos en estos años de trabajo.

Los resultados presentados en esta tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones y comunicaciones científicas:

- **Póster:** Factores predictores de la respuesta a neoadyuvancia de las metástasis hepáticas de carcinoma colorectal. XXVIII Congreso Nacional SEAP-IAP, XXII Congreso Nacional SEC y III Congreso nacional SEPAF. Santander. 2015
- **Póster:** Características morfológicas de la respuesta a la neoadyuvancia en metástasis hepáticas de carcinoma colorectal. XXVIII Congreso Nacional SEAP-IAP, XXII Congreso Nacional SEC y III Congreso nacional SEPAF. Santander. 2015
- **Publicación:** PLK-1 Expression is Associated with Histopathological Response to Neoadjuvant Therapy of Hepatic Metastasis of Colorectal Carcinoma. Fernández-Aceñero MJ, Cortés D, Gómez Del Pulgar T, Cebrián A, Estrada L, Martínez-Useros J, Celdrán A, García-Foncillas J, Pastor C. Pathol Oncol Res. 2015 Nov 17
- **Publicación:** Cortés Guiral D, Fernández-Aceñero MJ, García-Olmo D, Pastor Idoate C. Factors Predicting Response to Neoadjuvant Therapy of Hepatic Metastasis from Colorectal Carcinoma. Int J Pathol Clin Res 2015;1:009
- **Publicación:** Fernández-Aceñero M J, Cortés-Guiral D, Munoz L E, Martínez-Useros J, Pastor-Idoate C. Morphological aspects of the hepatic response to neoadjuvant therapy. Pathology-Research and Practice, 2015;211(9), 665-670.
- **Publicación:** D.Cortés-Guiral, C.Pastor-Idoate, C.Díaz del Arco, L.del Puerto-Nevado, M.J.Fernández-Aceñero, CPEB4 immunohistochemical expression is ~ associated to prognosis in stage IV colorectal carcinoma, Pathology - Research and Practice <http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2017.04.020>

## GUIÓN FIGURAS Y TABLAS

### FIGURAS

- Figura 1. Incidencia de los tipos de cáncer más frecuentes en España. Tomada de Instituto Nacional de Estadística (INE). Página 21.
- Figura 2. Efecto del estado del margen quirúrgico sobre la supervivencia y la recaída tras la resección hepática de las metástasis de cáncer colorrectal Pawlik. Ann Surg. 2005. Página 26.
- Figura 3. Imagen de técnica de radiofrecuencia. Página 29.
- Figura 4. Imagen de afectación hepática masiva. Página 30.
- Figura 5. Supervivencia global de acuerdo al número de metástasis hepáticas y PCI (índice de carcinomatosis peritoneal) después de tratamiento quirúrgico con intención curativa. Página 32.
- Figura 6. Porcentaje de respuesta en ensayos de pacientes con enfermedad metastásica hepática irresecable de inicio. Página 34.
- Figura 7. Curvas de correlación de supervivencia de acuerdo a radicalidad de la extirpación quirúrgica de las metástasis hepáticas. Página 36.
- Figura 8. Impacto de la adición de Cetuximab en el porcentaje de respuestas en cáncer colo-rectal metastásico en hígado. Página 37.
- Figura 9. La adición de Bevacizumab a FOLFOX incrementa el porcentaje de respuesta comparado con FOLFOX independientemente de la duración del tratamiento. Página 38.
- Figura 10. Imagen de la respuesta morfológica a neoadyuvancia según los criterios de Blazer. Página 42.
- Figura 11. Respuesta morfológica a neoadyuvancia según los criterios de Rubbia-Brandt. Página 43.
- Figura 12. Curvas de supervivencia de acuerdo a la respuesta histológica a neoadyuvancia. Blazer et al. Página 44.
- Figura 13. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia global en las metástasis hepáticas con expresión positiva y negativa de PLK-1. Página 63.



Figura 14. Curvas de Kaplan-Meier comparando la supervivencia de pacientes con valores de TNI mayores de 2,5 mm y menores de 2,5 mm. Página 69.

## TABLAS

- Tabla 1: NCCN Guidelines Version 2.2016 Clasificación TNM cáncer de colon. Páginas 22 y 23.
- Tabla 2: NCCN Guidelines Version 2.2016 Clasificación por estadios del cáncer de colon . Página 24.
- Tabla 3. Resumen de los Criterios RECIST 1.1 y de los criterios radiológicos modificados. Página 41.
- Tabla 4. Criterios de inclusión. Página 49.
- Tabla 5. Características demográficas de la serie de pacientes. Página 57.
- Tabla 6. Parámetros de evolución de la serie de pacientes. Página 58.
- Tabla 7. Características generales tumorales. Página 58.
- Tabla 8. Asociación entre expresión de PLK-1 en las metástasis hepáticas y respuesta a tratamiento. Página 61.
- Tabla 9. Valor pronóstico de la respuesta histopatológica a neoadyuvancia con respecto a la supervivencia libre de progresión (SLP) y la supervivencia global (SG). Página 62.
- Tabla 10. Asociación entre resultados de supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG) y la expresión de PLK-1 en el tumor primario y en las metástasis. Página 62.
- Tabla 11. Análisis univariante: asociaciones estadísticamente significativas. Página 63.
- Tabla 12. Características histopatológicas del tumor primario. Página 65.
- Tabla 13. Características histopatológicas de las metástasis hepáticas. Páginas 66 y 67.
- Tabla 14. Valor pronóstico de la respuesta histopatológica a neoadyuvancia con respecto a la supervivencia libre de progresión (SLP) y la supervivencia global (SG). Página 69.

## **ABREVIATURAS**

- CA 109-9: Antígeno carbohidrato 19-9
- CEA: Antígeno carcino embrionario
- CCR: cáncer colo-rectal
- SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica
- INE: Instituto Nacional de Estadística
- NCCN: National Comprehensive Cancer Network
- MAC: Clasificación modificada de Astler-Coller
- HIPEC: Quimioterapia intraperitoneal hipertérmica
- PCI: Índice de carcinomatosis peritoneal
- FOLFOX: Folinic acid, Fluorouracil, Oxaliplatin
- ESMO: European Society for Medical Oncology
- ASCO: American Society of Clinical Oncology
- PLK1: polo-like kinase 1
- RECIST: Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
- SG: Supervivencia global
- SLP: Supervivencia libre de progresión
- TMA: Micromatrices de tejidos
- TNI: Superficie de transición tumor-normal
- TRG: Tumor regression grade scoring system

# Índice

## **INTRODUCCIÓN (Página 19)**

### **1. Situación actual del cáncer colo-rectal en nuestro medio. Epidemiología.**

**(Página 20)**

### **2. Cáncer colo-rectal metastásico (Página 22)**

#### **2.1 Opciones terapéuticas del cáncer colo-rectal metastásico en hígado**

##### **2.1.1 Cirugía (Página 25)**

##### **A. Opciones de tratamiento de las metástasis sincrónicas**

**(Página 26)**

a. Resección simultánea

b. Resección metacrónica

i. “Primero el primario” tumor primario – metástasis

ii. Secuencia Inversa

##### **B. Estrategias para aumentar el número de pacientes**

**resecables (Página 28)**

a. Embolización portal

b. Radiofrecuencia

c. Resección en dos tiempos

d. Hepatectomías repetidas

e. Cirugía hepática extrema

##### **C. Tratamiento de las metástasis hepáticas en presencia de**

**carcinomatosis peritoneal (Página 31)**

## **2.1.2. Quimioterapia (Página 34)**

### **a) Quimioterapia adyuvante (Página 32)**

### **b) Quimioterapia neoadyuvante (Página 35)**

- i. Quimioterapia de conversión
- ii. Quimioterapia intra-arterial hepática

### **c) Valoración de la Respuesta a Quimioterapia Neoadyuvante (Página 39)**

#### **i. Respuesta a quimioterapia neoadyuvante (Página 39)**

##### **1. Criterios de respuesta radiológica**

- a. Criterios RECIST 1.1
- b. Criterios radiológicos modificados TC propuestos por Choi

##### **2. Criterios de respuesta morfológica**

- a. Criterios de Blazer
- b. Respuesta morfológica a neoadyuvancia según los criterios de Rubbia-Brandt
- c. Valor pronóstico de la respuesta histológica a neoadyuvancia

#### **ii. PLK-1 y respuesta a quimioterapia neoadyuvante (Página 45)**

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS (Página 46)**

### **1. Hipótesis (Página 47)**

### **2. Objetivos (Página 47)**

- a) **Objetivo principal**
- b) **Objetivos secundarios**

## **PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS (Página 48)**

### **1. Pacientes incluidos en el estudio (Página 49)**

### **2. Análisis del tejido tumoral (Página 49)**

### **3. Variables analizadas (Página 51)**

#### **1. Variables demográficas y clínicas de los pacientes (Página 51)**

- a) Edad
- b) Sexo
- c) Comorbilidades
- d) Historia familiar de cáncer
- e) Historia personal de cáncer
- f) Localización del tumor primario
- g) Estadio T tumor primario
- h) Estadio N tumor primario
- i) CEA en el momento del diagnóstico
- j) Respuesta histopatológica a la quimioterapia
- k) Recaída
- l) Tiempo hasta la recaída en meses (supervivencia libre de progresión)

m) Exitus

n) Tiempo hasta fallecimiento a causa del tumor en meses  
(supervivencia global)

## **2. Variables histopatológicas del tumor primario (Página 52)**

a) Diferenciación

b) Localización

1. Colon

2. Sigma-recto

c) Invasión linfática

d) Reacción inflamatoria linfocítica

e) Desmoplasia

f) Producción de mucina

g) Frente de avance

h) Estadío pT

i) Estadío pN

## **3. Variables de las metástasis hepáticas (Página 53)**

a) Respuesta morfológica a la neoadyuvancia, según los  
criterios de Blazer

b) Respuesta morfológica a neoadyuvancia según los criterios  
de Rubbia-Brandt

## **4. Variables morfológicas metástasis hepática (Página 53)**

1. Invasión vascular

2. Invasión conductos biliares

3. Invasión parénquima hepático
4. Invasión perineural
5. Satelitosis
6. Grado de diferenciación
  - a. Alto
  - b. Bajo
  - c. Mucinoso
7. Reacción inflamatoria en el nódulo tumoral
  - a. Intensa
  - b. Escasa
  - c. Ausente
8. Tipo de respuesta inflamatoria
  - a. Linfocitaria
  - b. Histiocitaria
  - c. Polinuclear
9. Espesor del tumor en la zona de interfase tumor-normal (TNI)

#### **4. Análisis estadístico (Página 54)**

1. Análisis descriptivo
2. Análisis univariable de asociación:
  - a) Xi cuadrado
  - b) Prueba t de Student o ANOVA
3. Análisis de supervivencia:

#### **5. Aspectos éticos/Confidencialidad de los datos (Página 55)**



## **RESULTADOS (Página 56)**

### **1. Resultados globales (Página 57)**

- a. Características demográficas pacientes
- b. Características generales de los pacientes
- c. Características generales de los tumores
- d. Características analíticas de los pacientes

### **2. Influencia pronóstica y predictora de respuesta de PLK-1 (Página 59)**

- a. Relación de PLK1 y variables demográficas
- b. Expresión de PLK-1 en el tumor primario y en las metástasis
- c. Relación de PLK1 con las características histopatológicas del tumor primario
- d. Niveles de PLK1 y su relación con la respuesta
- e. Niveles de PLK-1 y su asociación con la supervivencia

### **3. Características que definen y se asocian con respuesta a neoadyuvancia (Página 63)**

- a. **Variables clínicas y analíticas**
  - i. Niveles de CEA
- b. **Variables histopatológicas del tumor primario**
- c. **Variables de las metástasis hepáticas**
  - i. Variables morfológicas metástasis hepáticas
  - ii. Características histopatológicas de las metástasis hepáticas

- iii. Respuesta morfológica a la neoadyuvancia, según los criterios de Blazer
- iv. Factores asociados con la respuesta a neoadyuvancia de las metástasis hepáticas
  - 1. Grosor de la superficie tumor-normal
  - 2. Seudo-cápsula
  - 3. Respuesta inflamatoria

#### **4. Análisis de los factores relacionados con la supervivencia (Página 68)**

- a. En el tumor primario
- b. Respuesta histopatológica
- c. Factores relacionados con las metástasis hepáticas
  - i. TNI
  - ii. Fibrosis
  - iii. Mucina
  - iv. Satelitosis

### **DISCUSIÓN (Página 71)**

- 1. Influencia pronóstica de PLK-1 (Página 72)
- 2. Características demográficas de la serie (Página 75)
- 3. Respuesta a neoadyuvancia de las metástasis (Página 76)
- 4. Factores pronósticos en cáncer colo-rectal metastásico (Página 79)

**CONCLUSIONES** (Página 85)

**REFERENCIAS** (Página 86)

**ANEXO I (Página 96):** Publicaciones generadas por la Tesis (Página 97)

# Introducción

## INTRODUCCIÓN

### 1. Situación actual del cáncer colo-rectal en nuestro medio. Epidemiología.

El cáncer colo-rectal (CCR) es uno de los tumores más frecuentes en nuestro medio (1).


Según el registro de tumores nacional de SEOM (Sociedad Española de Oncología Médica) los datos desglosados por sexos muestran que en varones el CCR es el tercero en frecuencia, por detrás del cáncer de pulmón y próstata. En las mujeres es el segundo en frecuencia, detrás del de mama (Figura 1). Sin embargo, si se tienen en cuenta ambos sexos el cáncer con mayor incidencia es el colo-rectal (15%). Se calcula una incidencia de 32.240 pacientes al año en España, siendo responsable de 14.700 fallecimientos y una prevalencia a cinco años de 89.705 casos. La incidencia de casos ha experimentado un crecimiento exponencial en la última década. Esto es atribuible por un lado al incremento de la edad media en nuestra pirámide poblacional y por otro al establecimiento de programas de detección precoz del cáncer colo-rectal a nivel nacional. (2)

Solamente un 10% de los casos se diagnostican por debajo de los 50 años y se asume que los pacientes diagnosticados por debajo de esta edad tienen predisposición genética. El máximo número de casos se diagnostican en torno a los 70 años, aunque se registran casos desde los 35-40 años.


La literatura describe otros factores predisponentes para el desarrollo de CCR como son; edad, dieta, obesidad o síndrome metabólico, enfermedades inflamatorias intestinales, hiperinsulinemia y síndromes hereditarios polipósicos (3) (síndrome de Lynch y poliposis adenomatosa familiar) Las enfermedades hereditarias constituyen un porcentaje muy bajo de los casos y más del 90% de los cánceres de colon y recto se asumen como esporádicos. (4)

Figura 1. Incidencia de los tipos de cáncer más frecuentes en España. Tomada de Instituto Nacional de Estadística (INE)

#### Incidencia del cáncer en España – hombres

	Próstata	17,32 %
	Pulmón	16,56 %
	Colorrectal	12,81 %
	Vejiga urinaria	10,63 %
	Cavidad oral y faringe	5,77 %
	Estómago	4,81 %
	Laringe	3,91 %
	Linfoma no Hodgkin	3,04 %
	Hígado	2,75 %
	Riñón	2,24 %

#### Incidencia del cáncer en España – mujeres

	Mama	28,35 %
	Colorrectal	13,76 %
	Útero	9,29 %
	Ovario	4,22 %
	Estómago	4,21 %
	Linfoma no Hodgkin	4,06 %
	Pulmón	3,09 %
	Melanoma de piel	2,75 %
	Vejiga urinaria	2,72 %
	Páncreas	2,69 %

Fuente: Cancer Incidence in Five Continents, Vol. IX (CIS-Vol IX), IARC.  
Fuente: Instituto Nacional de Estadística (INE).

## 2. Cáncer colo-rectal metastásico

Aproximadamente el 50% de los pacientes con CCR presentan enfermedad a distancia o metastásica en el momento del diagnóstico, siendo clasificada como un estadio IV. (5,6)

Tabla 1: NCCN Guidelines Version 2.2016 Clasificación TNM del cáncer de colon

<b>TNM</b>	
<b>Tumor Primario T</b>	
Tx	El tumor primario no puede ser valorados
T0	Sin evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ: intraepitelial o invasión de la lámina propia
T1	El tumor invade la submucosa
T2	El tumor invade la muscular propia
T3	El tumor invade a través de la muscular propia hasta los tejidos pericolónicos
T4a	El tumor penetra la superficie del peritoneo visceral
T4b	El tumor invade o se adhiere a otros órganos

<b>Ganglios linfáticos regionales N</b>	
Nx	Los ganglios linfáticos regionales no puede ser valorados
N0	Sin metástasis en ganglios linfáticos
N1a	Metástasis en 1 ganglio linfático regional
N1b	Metástasis en 2-3 ganglios linfáticos regionales
N1c	Depósitos tumorales en la subserosa, mesenterio o en los tejidos pericolónicos o peri-rectales no peritoneizados sin metástasis ganglionares
N2	Metástasis en 4 o más ganglios linfáticos regionales
N2a	Metástasis en 4-6 ganglios linfáticos regionales
N2b	Metástasis en 7 o más ganglios linfáticos regionales
<b>Metástasis a distancia M</b>	
M0	Sin metástasis a distancia
M1	Con metástasis a distancia
M1a	Metástasis confinadas a un órgano o región (por ejemplo hígado, pulmón, ovario, ganglios linfáticos no regionales)
M1b	Metástasis en más de un órgano o región o en peritoneo



Tabla 2: NCCN Guidelines Version 2.2016 Clasificación por estadios del cáncer de colon

<b>Estadio</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>Dukes</b>	<b>MAC*</b>
0	Tis	N0	M0	-	-
I	T1	N0	M0	A	A
	T2	N0	M0	A	B1
IIA	T3	N0	M0	B	B2
IIB	T4a	N0	M0	B	B2
IIC	T4b	N0	M0	B	B3
IIIA	T1-T2	N1/N1c	M0	C	C1
	T1	N2a	M0	C	C1
IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0	C	C2
	T2-T3	N2a	M0	C	C1/C2
	T1-T2	N2b	M0	C	C1
IIIC	T4a	N2a	M0	C	C2
	T3-T4a	N2b	M0	C	C2
	T4b	N1-N2	M0	C	C3
IVA	Cualquier T	Cualquier N	M1a	-	-
IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1b	-	-

MAC\*: Clasificación modificada de Astler-Coller

La afectación metastásica más frecuente en el CCR es la hepática, que; ocurre de forma simultánea en el 15% de los casos o de forma metacrónica durante el seguimiento oncológico tras el tratamiento. La incidencia acumulada de metástasis metacrónicas depende el estadio inicial del CCR siendo según la clasificación TNM de: 3,7% para estadio I, 13,3 % para estadio II y 30,4% para estadio III. (7)

La supervivencia a 1 y 5 años es del 34,8 y del 3,3% para los pacientes con metástasis sincrónica y del 37,6 y 6,1% para los pacientes con lesiones metacrónicas, respectivamente. (7)

## **2.1 Opciones terapéuticas del cáncer colo-rectal metastásico en hígado**

La cirugía de las metástasis hepáticas está considerada como el tratamiento curativo y con mayor impacto en la supervivencia a largo plazo del cáncer colo-rectal metastásico en hígado. (8)

Se debe reseñar que la cirugía con intención curativa de entrada se puede realizar en aproximadamente un 7% de los pacientes con metástasis sincrónicas y en 17% de las metacrónicas. Sin embargo, distintas técnicas como la administración de quimioterapia sistémica ó intra-arterial (intrahepática) y algunas técnicas de ablación pueden contribuir a aumentar el número de pacientes candidatos a cirugía.

Desde hace años se objetivó que la cirugía con intención curativa aumenta la supervivencia y las series de 1989 mostraban una supervivencia a 5 años inexistente para los pacientes no tratados quirúrgicamente frente al 35-50% de supervivencia para aquellos intervenidos con intención radical oncológica de su proceso metastásico hepático. (9)

Con los actuales tratamientos combinados de cirugía y las modernas quimioterapias sistémicas la supervivencia actuarial publicada se ha ido incrementando progresivamente, pasando de unos valores del 87, 57 y 36% de supervivencia a los 1, 3 y 5 años, respectivamente, en el año 2000 (10) (11) a las cifras actuales, que oscilan alrededor del 92, 60 y 46,1% en estos mismos períodos . (12)

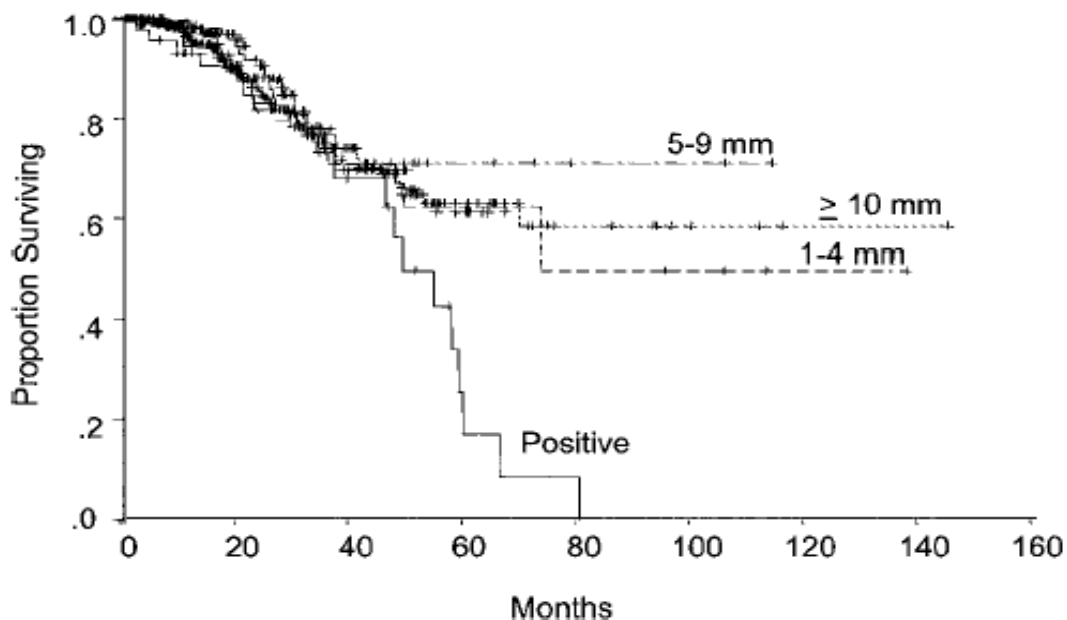
### **2.1.1 Cirugía**

La cirugía de las metástasis hepáticas está indicada siempre que se vaya a realizar una cirugía radical del tumor primario, bien sincrónicamente ó de forma secuencial habitual ó inversa con la enfermedad hepática. Así mismo, la cirugía hepática debe ser radical, buscando la resección completa y oncológica de las metástasis, respetando siempre

que el volumen hepático residual debe ser del 20% y que al menos deben quedar dos segmentos contiguos.

La técnica quirúrgica de resección de las metástasis hepáticas puede ser anatómica (segmentectomía ó hepatectomía) ó extra-anatómica, pero es importante que el margen de resección sea adecuado. Parece que la distancia mínima recomendable al margen es 1 mm. Cuando se afecta el margen la supervivencia se reduce drásticamente, como se puede observar en la figura anexa. (13)

Figura 2. Efecto del estado del margen quirúrgico sobre la supervivencia y la recaída tras la resección hepática de las metástasis de cáncer colorrectal Pawlik. Ann Surg. 2005.



Si la resección es viable, ésta se recomienda incluso en caso de enfermedad extrahepática, ya que con una adecuada estrategia médico-quirúrgica, que suele incluir quimioterapia previa a la resección, la supervivencia a 5 años puede alcanzar 10-28%. (14)

#### A). Opciones de tratamiento de las metástasis sincrónicas

El cáncer colo-rectal con metástasis sincrónicas requiere diseñar una estrategia de tratamiento multidisciplinar que puede incluir la necesidad de quimio-radioterapia en caso de cáncer de recto y tratamiento de las metástasis hepáticas con cirugía ó radiofrecuencia.

Es muy importante en estos pacientes seleccionar aquellos que se van a beneficiar de la resección hepática. Por eso muchos grupos plantean la quimioterapia neoadyuvante de inicio, para valorar la respuesta de la enfermedad sistémica y poder evitar tratamientos quirúrgicos de inicio en pacientes con biología desfavorable. Además la quimioterapia de primera línea presenta una tasas de respuesta importantes (15), lo que permite abordar la enfermedad hepática, que es lo que va a condicionar el pronóstico de estos pacientes.

No hay actualmente un consenso sobre la secuencia de tratamiento y hay tres opciones aceptadas en cuanto al manejo del primario y las metástasis hepáticas: resección simultánea, primero el primario ó primero el hígado. Todas son opciones válidas dado que un meta-análisis que revisó las tres estrategias demostró que ninguna es inferior a las otras (16), que ninguno de los abordajes tiene ofrece mejores resultados a corto ó largo plazo, ni que pacientes se benefician más de cada abordaje, considerando que los pacientes con primario sintomático no pueden ser tratados según el esquema “primero hígado”.

a. Resección simultánea

En el mismo acto quirúrgico se extirpa el tumor primario y las metástasis hepáticas, lo que puede implicar una mayor complejidad de la intervención y el postoperatorio (17).

b. Resección metacrónica

i. “Primero el primario”: Secuencia tumor primario – metástasis

Es la secuencia clásica, en la que el primario se resecta en una primera intervención y en otra intervención posterior se abordan las metástasis hepáticas (18). Fue de elección durante años porque se consideraba que era importante evitar complicaciones del primario (obstrucción, perforación, sangrado) y tratar la fuente de las metástasis, pero hay que tener muy en cuenta el riesgo de que se produzca una progresión hepática, llegando a convertir la lesión en irresecable, durante el tratamiento del primario, especialmente si hay complicaciones postoperatorias.

## ii. Secuencia inversa

También llamado “ primero hígado” y consiste en resear primero las metástasis hepáticas y en una segunda intervención abordar el tratamiento quirúrgico del tumor primario (19); así se evita el incremento del riesgo de un abordaje simultáneo y de la progresión hepática si se retrasa el tratamiento de las metástasis.

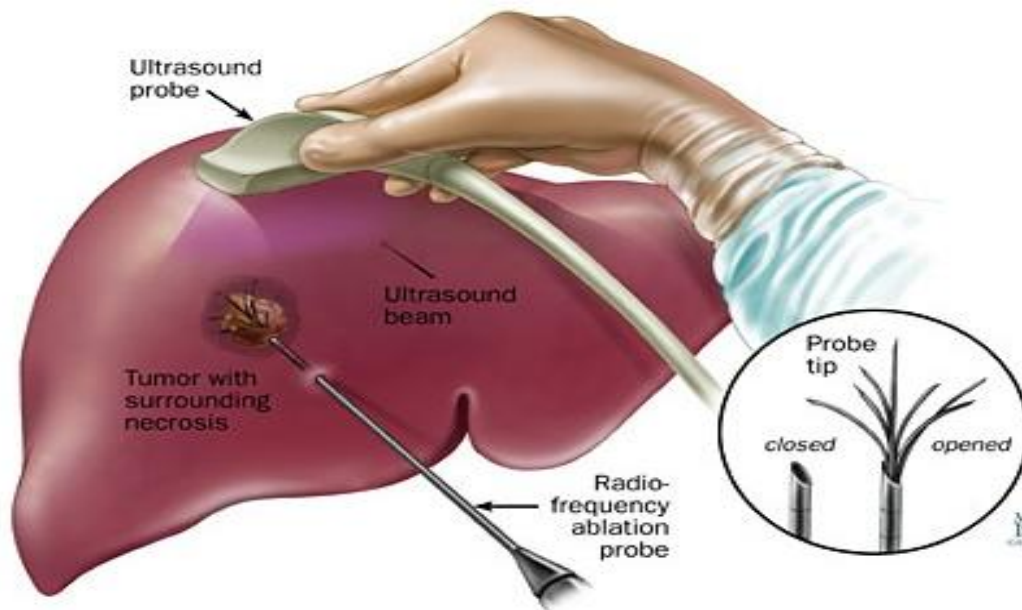
## B. Estrategias para aumentar el número de pacientes resecables

Parece claro que el objetivo fundamental es aumentar la resecabilidad y poder intervenir el mayor número de pacientes garantizando la radicalidad de la extirpación de las metástasis, ya que esto es lo que va a conseguir incrementar la supervivencia. Para conseguir que el mayor número de pacientes sean candidatos quirúrgicos en los últimos años se han desarrollado una serie de estrategias, entre ellas la quimioterapia neoadyuvante, la embolización portal, la resección combinada con radiofrecuencia, la resección en 2 tiempos y la cirugía hepática extrema. (20)

- a. Mediante la **embolización portal** selectiva de una de las principales ramas de la vena porta se puede conseguir una hipertrofia de entre un 10 y un 20% en un plazo de 3 a 9 semanas. El volumen residual hepático mínimo es de un 20-25% en caso de hígado sano y de un 40% si el paciente ha recibido quimioterapia sistémica previamente. (20)
- b. La **radiofrecuencia** bien de forma percutánea ó abierta, como técnica única ó como complemento a la cirugía consigue un control local del 78% de las lesiones menores de 2,6 cm y un control local del 32% de las lesiones mayores de 4 cm, por eso, en principio no está indicada en lesiones mayores de 3 cm. Tiene menor efectividad en lesiones adyacentes a grandes vasos, ya que se produce una rápida disipación

del calor. La ablación percutánea es una alternativa para pacientes inoperables debido a sus comorbilidades. (20)

Figura 3. Imagen de técnica de radiofrecuencia



- c. La **resección en dos tiempos** es una técnica quirúrgica que se ha desarrollado para los casos de lesiones muy extensas y multindoluales. Cuando se realiza en centros de referencia se pueden conseguir supervivencias del 42 % a los 5 años. Cabe destacar que en la segunda intervención se registran lógicamente mayores tasas de morbi-mortalidad. (21)

Figura 4. Imagen de afectación hepática masiva



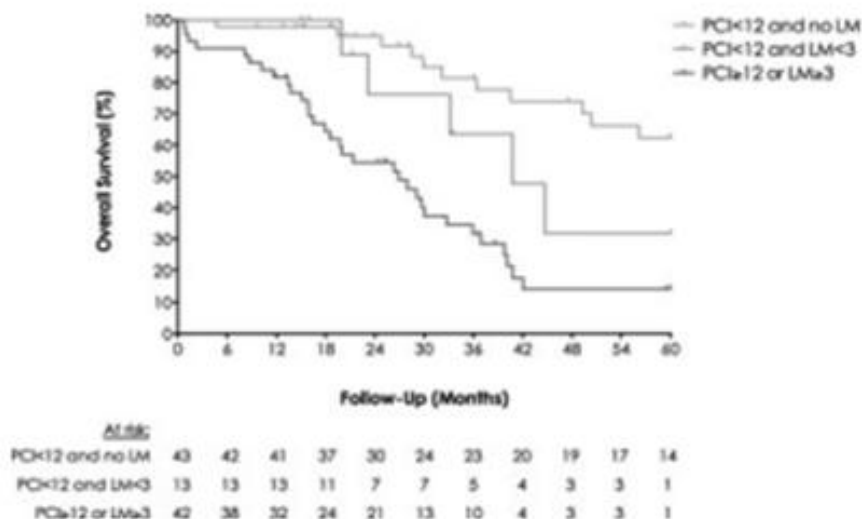
- d. La técnica de las **hepatectomías repetidas** por progresión ó recaída, realizada en centros de referencia consigue tasas de supervivencia a 5 años del 65% en pacientes muy seleccionados. Para aquellos pacientes que tras la segunda hepatectomía presentaron recaída ó progresión y no volvieron a operarse, la supervivencia a los 5 años es del 5%, mientras que para aquellos que se sometieron a la tercera hepatectomía la supervivencia a los 5 años fue de 32%. (20)
- e. La **cirugía hepática extrema** se ha desarrollado en los últimos años para tratar a los pacientes con afectación de estructuras vasculares principales del hígado por las metástasis. Mediante técnicas de reconstrucción vascular y con exclusión vascular total hepática ó perfusión hipotérmica hepática cuando la complejidad de la cirugía y reconstrucción requiera una exclusión vascular de más de 60 min, llegándose a publicar una supervivencia a los 5 años del 38,3%. (22) (23)

### C) Tratamiento de las metástasis hepáticas en presencia de carcinomatosis peritoneal

Desde los principales institutos oncológicos europeos se recomienda incluso el abordaje quirúrgico de la enfermedad metastásica hepática de origen colo-rectal en presencia de carcinomatosis peritoneal. El tratamiento incluye una citorreducción completa de la enfermedad peritoneal, el tratamiento de las metástasis hepáticas mediante cirugía ó radiofrecuencia y se finaliza la intervención si se ha logrado la radicalidad con la aplicación de quimioterapia intraperitoneal hipertérmica (HIPEC), habitualmente con un esquema de oxaliplatino e irinotecan con 5FU y ácido folínico intravenoso. No obstante, se establecen unos criterios para poder obtener beneficio en la supervivencia de estos pacientes. Las limitaciones son el número de metástasis hepáticas (menor ó igual a 3) y el índice de carcinomatosis peritoneal (PCI de hasta 12). Los pacientes con carcinomatosis peritoneal de origen colo-rectal sin metástasis hepáticas tratados mediante citorreducción y HIPEC y con PCI < 12 tienen una supervivencia global (SG) de 76 meses, los pacientes con PCI < 12 y 1 ó 2 metástasis una SG de 40 meses. Los pacientes con PCI >12 y 3 ó más metástasis presentan una SG de 27 meses (24). Una adecuada selección de estos pacientes es fundamental.



Figura 5. Supervivencia global de acuerdo al número de metástasis hepáticas y PCI (índice de carcinomatosis peritoneal) después de tratamiento quirúrgico con intención curativa.



## 2.1.2. Quimioterapia

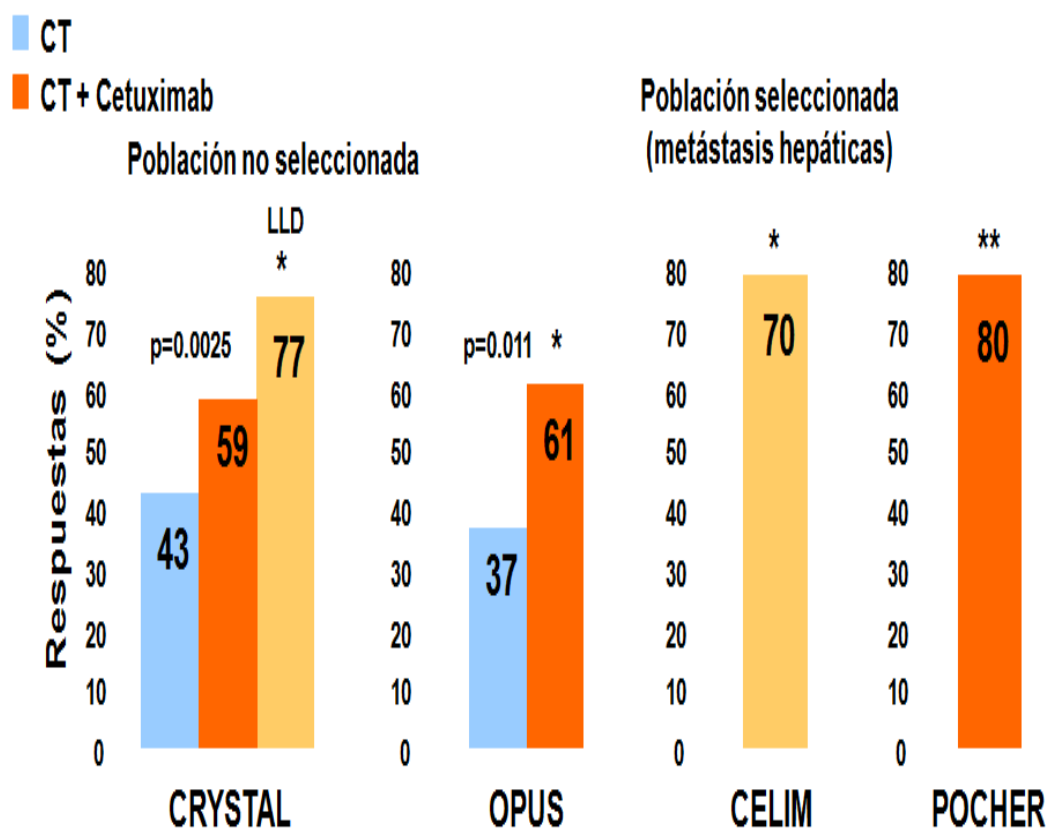
### a) Quimioterapia adyuvante

Tras la cirugía la quimioterapia adyuvante está admitida como estándar y múltiples estudios han demostrado los beneficios en supervivencia global (SG) y supervivencia libre de enfermedad (SLE) con la adyuvancia. Los tres estudios principales son el FFCG 9002 que comparaba adyuvancia con 5-FU frente a observación en 173 pacientes con una diferencia en SLP a 5 años de 34 y 27% respectivamente, así como una SG del 51 frente al 41%, resultados similares y confirmados por EORTC/NCIC FFCD 9002. El último de los ensayos que sustentan la administración de quimioterapia a los pacientes con metástasis resecables es el EORTC-40983 NCT00006479 donde se comparaba un grupo de pacientes que recibió 6 ciclos de FOLFOX preoperatorio y 6 postoperatorio vs sólo resección quirúrgica. No hubo diferencia en la supervivencia global, aunque un análisis ulterior se demostró una SLP a 3 años del 35 frente al 28% ( $p=0,0056$ ). (25)

Aunque ninguno de estos estudios aporta evidencia grado 1 sobre si la quimioterapia perioperatoria o postoperatoria mejora la SG de pacientes sometidos a resección de metástasis hepáticas, los resultados del último justifican para muchos oncólogos y cirujanos la quimioterapia perioperatoria.

Se han planteado ó están en marcha múltiples estudios para valorar el papel de la quimioterapia en aquellos pacientes con metástasis hepáticas consideradas irresecables de inicio (Figura 6). El estudio POCHER publicó una respuesta en el 80% de los 43 pacientes tratados con 5FU, leucovorin, irinotecan, oxaliplatino y cetuximab, consiguiendo una resección de la afectación hepática R0 en el 60% de los pacientes (26). El estudio CRYSTAL comparaba pacientes con metástasis irresecables tratados con FOLFIRI vs Cetuximab-FOLFIRI, aumentando del 43 al 77% el porcentaje de pacientes con respuesta en el grupo con cetuximab (27). El estudio CELIM comparó en 114 pacientes con enfermedad irresecable los resultados tras neoadyuvancia con 8 ciclos de FOLFOX+Cetuximab vs FOLFIRI-Cetuximab, convirtiendo en resecables al 68% de los pacientes del primer grupo (logrando R0 en el 38%), frente al 57% del segundo grupo (30% de R0). La supervivencia global de los pacientes en los que se logró R0 fue de 46,7 meses frente a 27,3 meses del resto (28).

Figura 6. Porcentaje de respuesta en ensayos de pacientes con enfermedad metastásica hepática irresecable de inicio.



## **b) Quimioterapia neoadyuvante**

La administración de quimioterapia neoadyuvante a los pacientes con metástasis hepáticas resecables de inicio sigue siendo objeto de discusión. Dos son los estudios fundamentales sobre esta cuestión. El trabajo de Takana y cols. comparó la supervivencia a los 5 años de 71 pacientes tras la administración de quimioterapia y posteriormente cirugía vs sólo cirugía, obteniendo un 40% en el primer grupo vs 21 % en el segundo. De nuevo muchos oncólogos sugieren el beneficio de la quimioterapia neoadyuvante en pacientes resecables basándose en los resultados del EORTC-40983 NCT00006479. No obstante la mayor crítica a esto es que no puede diferenciarse el beneficio obtenido de la quimioterapia neoadyuvante de la quimioterapia postoperatoria.

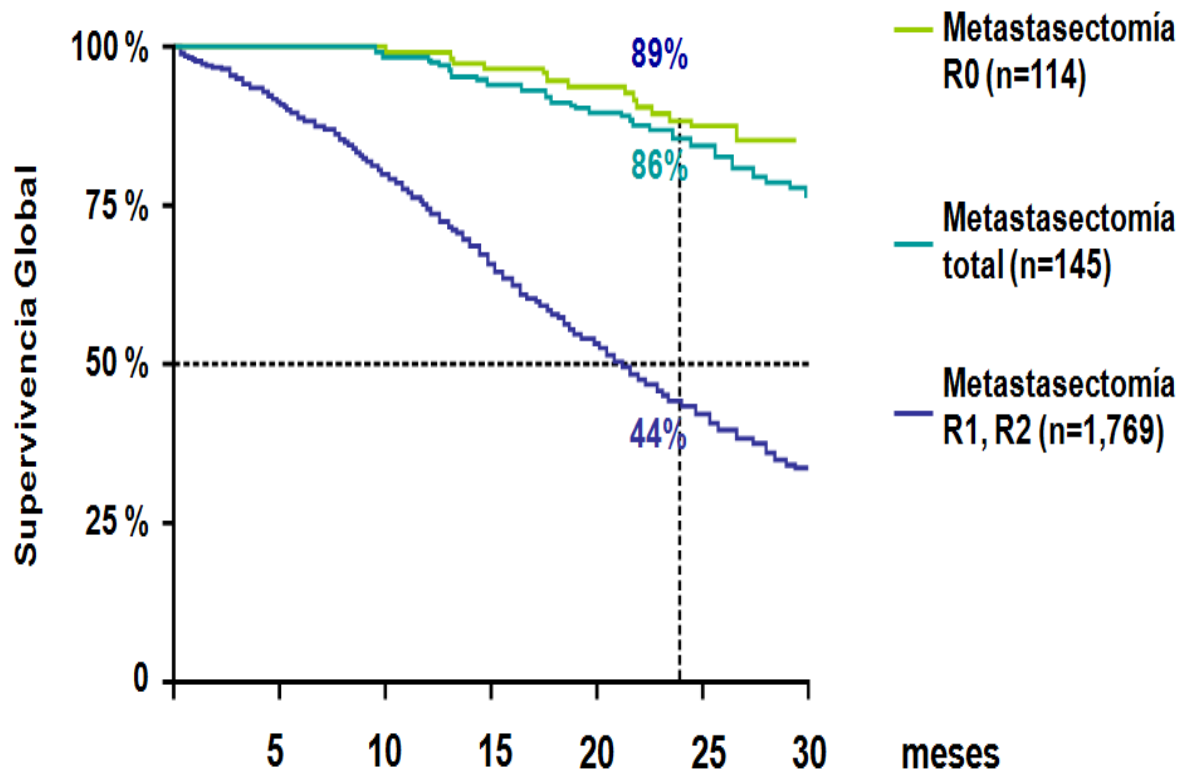
Muchos grupos rechazan la quimioterapia neoadyuvante en pacientes resecables por la toxicidad hepática que pueden producir determinados fármacos, especialmente la administración de oxaliplatino se asocia con daño sinusoidal y el irinotecán con esteatohepatitis. El estudio de Vauthey analizó la mortalidad postoperatoria en 406 pacientes con quimioterapia neoadyuvante, siendo del 6,5% en los pacientes con lesiones hepáticas, especialmente con esteatohepatitis y del 1,6% en los pacientes sin lesiones hepáticas (29).

Estos mismos grupos argumentan que es difícil distinguir radiológicamente las lesiones con respuesta parcial y que el PET deja de ser un método válido para valorar posteriormente la zona donde estaba la lesión metastásica.

El fundamental argumento a favor de la neoadyuvancia siempre es que aumenta la resecabilidad y desde hace años está claro que la radicalidad de la resección quirúrgica se correlaciona de forma muy significativa con la supervivencia, siendo a día de hoy, el principal factor pronóstico.

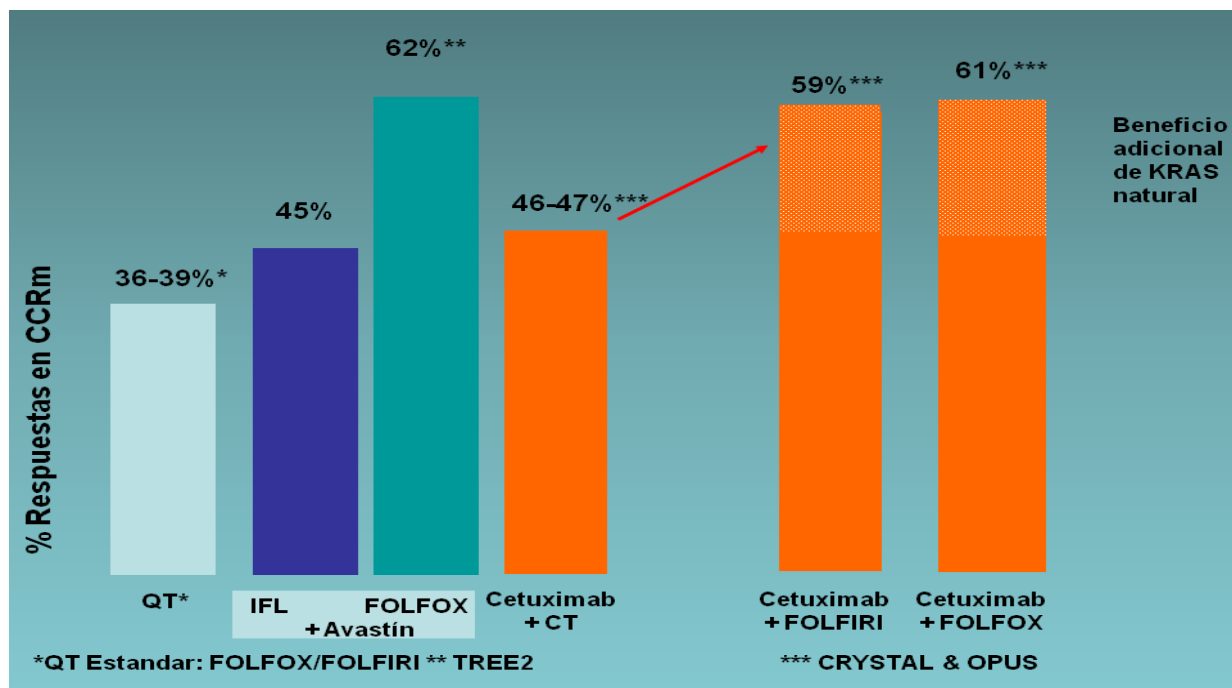
Esta gráfica refleja los resultados del trabajo presentado por van Cutsem y cols. ESMO 2008.

Figura 8. Curvas de correlación de supervivencia de acuerdo a radicalidad de la extirpación quirúrgica de las metástasis hepáticas.



La incorporación a los regímenes de quimioterapia de los nuevos fármacos dirigidos ha tenido un claro impacto en el porcentaje de respuestas radiológicas e histológicas y en consecuencia se deduce que aumentan la resecabilidad y por tanto la supervivencia.

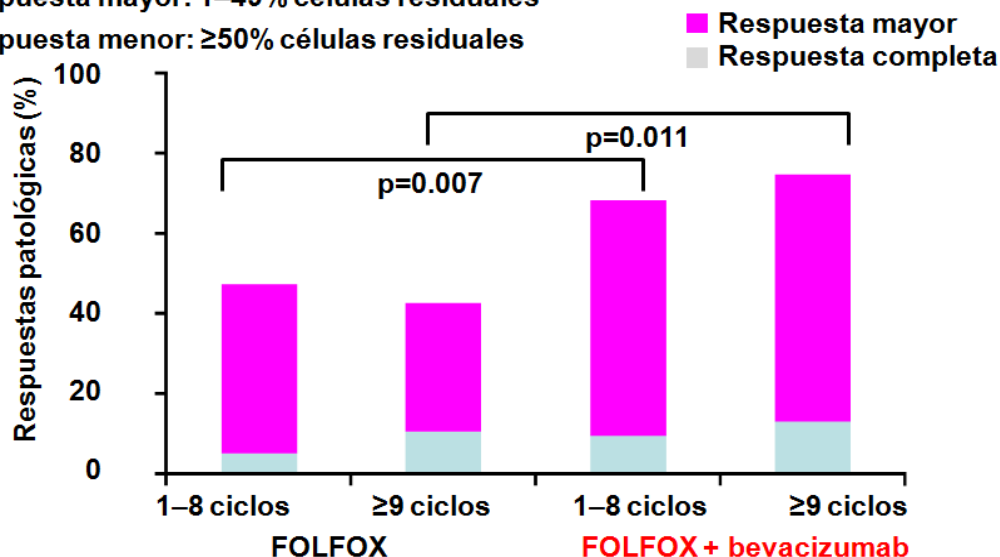
Figura 9. Impacto de la adición de Cetuximab en el porcentaje de respuestas en cáncer colo-rectal metastásico en hígado



Bevacizumab incrementa el número de respuestas mayores como muestra el trabajo presentado por Zorzi y cols. en ASCO GI 2009 y además tiene cierto efecto protector sobre la función hepática y produce dilatación sinusoidal. (30)

Figura 10. La adición de Bevacizumab a FOLFOX incrementa el porcentaje de respuesta comparado con FOLFOX independientemente de la duración del tratamiento

- Respuesta completa: no células residuales
- Respuesta mayor: 1–49% células residuales
- Respuesta menor:  $\geq 50\%$  células residuales



#### i. Quimioterapia de conversión

Los resultados de la serie de Bismuth (31) de pacientes irresecables intervenidos tras presentar respuesta a quimioterapia de inducción mostraron una supervivencia global a los 5 años del 40% (semejante a los pacientes resecables de inicio).

La tasa de respuesta se relaciona de forma directa con la resecabilidad (32) y por eso en pacientes se deben utilizar esquemas de inducción muy activos. Como hemos comentado anteriormente la revisión sistemática de Lam (19) mostró una tasa de respuesta en pacientes irresecables entre 43-79% permitiendo una resección R0 en el 23% de los pacientes que eran irresecables de inicio.

La tasa de respuestas en estudios prospectivos aleatorizados con primera línea de quimioterapia que incluya oxaliplatino ó irinotecán presentaron unas tasas de respuesta entre 36-66%. (33) (34)

La adición a estos esquemas de cetuximab parece aumentar la tasa de respuesta hasta un 68% en estudios aleatorizados (28) (35)

La adición de bevacizumab también aumentó la tasa de respuesta hasta un 65% en un estudio en fase III. (34)

ii. Quimioterapia intra-arterial hepática

Se desarrolló para administrar importantes dosis de quimioterapia en el hígado evitando la toxicidad sistémica, para tratar las posibles micrometástasis residuales tras resección hepática. Se ha demostrado que su administración junto con fluoropirimidas adyuvantes sistémicas aumenta la supervivencia libre de progresión (SLP) (36), pero no mejora la supervivencia global como muestra un meta-análisis de Cochrane, probablemente por la morbilidad y dificultades técnicas del procedimiento (37). Todo ello justifica que todavía no sea una técnica muy extendida.

**c. Valoración de la respuesta a quimioterapia neoadyuvante**

i.Respuesta a quimioterapia neoadyuvante

Las tasas de respuesta a quimioterapia con oxaliplatino o irinotecán son del 40-60% con una tasa de respuesta completa del 5-10%. De hecho las metástasis pueden volverse indetectables en las técnicas de imagen, aunque hasta en el 80% de las piezas de resección había tumor viable (38) en pacientes con una respuesta radiológica completa según los criterios RECIST.

La respuesta histológica a la neoadyuvancia se debe sobre todo a un sobrecrecimiento de la fibrosis más que a la necrosis. La respuesta histológica mayor parece asociarse con SLP y la respuesta mayor y parcial histológicas con SG (31).



## 1. Criterios de respuesta radiológica

### a. Criterios RECIST 1.1 (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) (39) (40) (41) (42)

Se basan en mediciones seriadas del tamaño tumoral para valorar la respuesta al tratamiento. Sin embargo presentan una correlación con la supervivencia global muy débil (43) (40). La última versión son los criterios RECIST 1.1 (41) que definen la respuesta tumoral del siguiente modo:

- RC (respuesta completa): Desaparición del tumor. No aparición de nuevas lesiones.
- RP (respuesta parcial): No aparición de nuevas lesiones con una disminución del tamaño de las existentes  $\geq 30\%$ .
- EE (enfermedad estable) No cumple criterios de RC; RP ni PE.
- PE (progresión de la enfermedad): Aparición de nuevas lesiones ó aumento en el diámetro de las previas  $\geq 20\%$ .

### b. Criterios radiológicos modificados TC propuestos por Choi (39)

- i. RC (respuesta completa): Desaparición del tumor. No aparición de nuevas lesiones.
- ii. RP:(respuesta parcial): Disminución del tamaño de la lesión  $\geq 10\%$  ó disminución  $\geq 15\%$  en la densidad del tumor.
- iii. EE (enfermedad estable): No cumple criterios de RC, RP ni PE.
- iv. PE (progresión de la enfermedad): Aumento del tamaño de la lesión  $\geq 10\%$  y no cumple criterios de RP en cuanto a la densidad del tumor.

Tabla 3. Resumen de los Criterios RECIST 1.1 y de los criterios radiológicos modificados

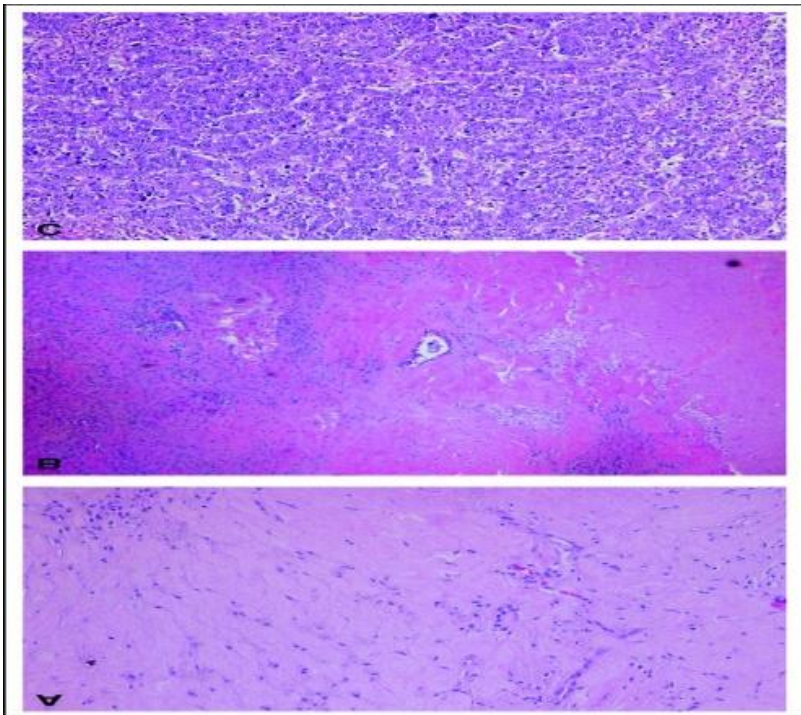
<b>Respuesta</b>	<b>RECIST 1.1</b>	<b>Criterios radiológicos modificados</b>
<b>Respuesta completa</b>	Desaparición del tumor. No aparición de nuevas lesiones.	Desaparición del tumor. No aparición de nuevas lesiones.
<b>RP (respuesta parcial)</b>	No aparición de nuevas lesiones con una disminución del tamaño de las existentes $\geq 30\%$	Disminución del tamaño de la lesión $\geq 10\%$ ó disminución $\geq 15\%$ en la densidad del tumor
<b>EE (enfermedad estable)</b>	No cumple criterios de RC; RP ni PE	No cumple criterios de RC, RP ni PE
<b>PE (progresión de la enfermedad)</b>	Aparición de nuevas lesiones ó aumento en el diámetro de las previas $\geq 20\%$	Aumento del tamaño de la lesión $\geq 10\%$ y no cumple criterios de RP en cuanto a la densidad del tumor

## 2. Criterios de respuesta morfológica a neoadyuvancia

### a. Criterios de Blazer (44)

- A: Respuesta completa (0% tumor residual)
- B: Respuesta mayor (1-49% células tumorales residuales)
- C: Respuesta menor ( $\geq 50\%$  células tumorales residuales)

Figura 11. Imagen de la respuesta morfológica a neoadyuvancia según los criterios de Blazer

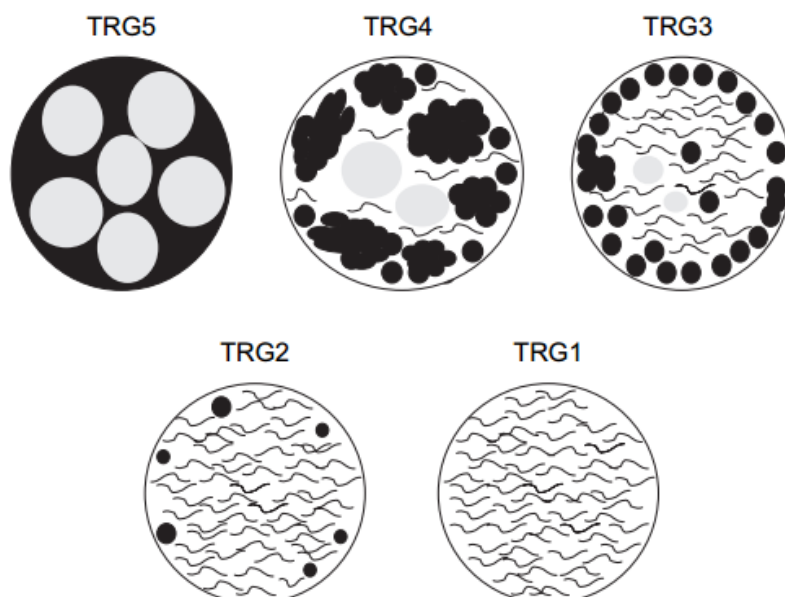


b. Criterios de Rubbia-Brandt (45)

TRG: Tumor regression grade scoring system.

- TRG 1: ausencia de tumor residual y gran cantidad de fibrosis
- TRG 2: escasas células tumorales dispersas entre la fibrosis
- TRG 3: Mayor cantidad de células tumorales pero con predominio de la fibrosis
- TRG 4: La cantidad de células tumorales predomina sobre la fibrosis
- TRG 5: no hay signos de respuesta

Figura 12. Respuesta morfológica a neoadyuvancia según los criterios de Rubbia-Brandt



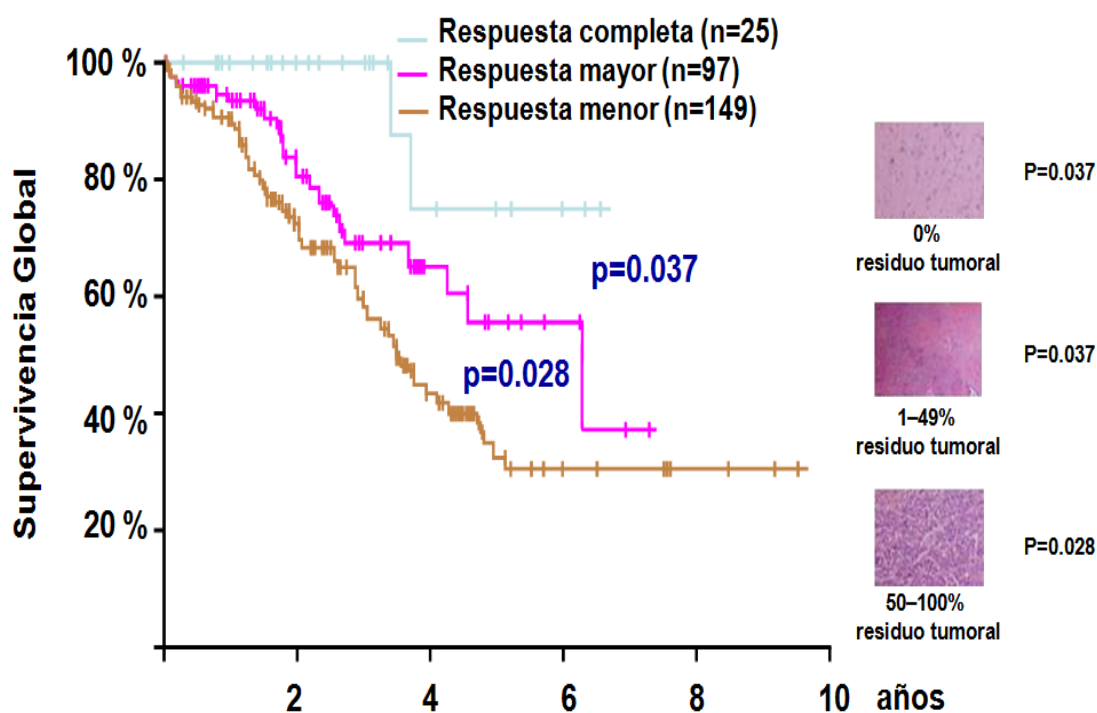
**Figure 1.** Tumor regression grade (TRG) scoring system. TRG1, absence of residual cancer and large amount of fibrosis; TRG2, rare residual cancer cells scattered throughout the fibrosis; TRG3, more residual tumor cells but fibrosis predominates; TRG4, residual cancer cells predominate over fibrosis; and TRG5, no signs of regression. Black area: tumor cells; gray area: necrotic area; fibrils: fibrosis.

c. Valor pronóstico de la respuesta histológica a neoadyuvancia

Rene Adam publicó los resultados de un grupo de pacientes tras neoadyuvancia observando una clara correlación entre la respuesta histológica de las lesiones y la supervivencia a uno y tres años. Un 58% de los pacientes presentaron respuesta, un 45 % estabilización de las lesiones y un 22% progresión. La supervivencia en su estudio alcanzó 100%, 84% y 63% y 58%, 45% y 0%, al año y a los 3 años para cada uno de estos grupos de respuesta.

Otro artículo que relaciona supervivencia y respuesta histológica es el de Blazer y cols. que reflejó una supervivencia global a 5 años del 75% para los pacientes con respuesta histológica completa (sin células residuales), del 56% para los pacientes con respuesta mayor (1-49% de células residuales) y un 33% para los pacientes con respuesta menor (50% ó más de células tumorales viables) (44)

- Figura 7. Curvas de supervivencia de acuerdo a la respuesta histológica a neoadyuvancia. Blazer y cols.



## ii. PLK-1 y respuesta a quimioterapia neoadyuvante

La cinasa 1 parecida a polo (PLK-1) es una proteína cinasa de serina/treonina expresada durante la mitosis y sobre-expresada in multiples neoplasias humanas, incluyendo leucemias (46) y también algunos tumores sólidos. (47) (48) (49).

Estudios recientes han mostrado que la expresión de PLK1 es un marcador pronóstico en los carcinomas uroteliales (50), de células renales (51) y de mama triple negativos (52). PLK1 actúa interfiriendo con el RNA y se ha visto que estimula la proliferación de las células leucémicas y el potencial clonogénico de las células tumorales de pacientes con cáncer. La inhibición de PLK1 es una prometedora estrategia terapéutica para algunos tumores, fundamentalmente la leucemia mieloide aguda y algunos inhibidores de PLK1 están siendo desarrollados como potenciales tratamientos oncológicos. No hay publicaciones sobre el potencial como marcador pronóstico de PLK1 en tumores gastrointestinales. En el Hospital Fundación Jiménez Díaz se han establecido varias líneas de trabajo en cáncer colo-rectal para intentar determinar el papel en la clínica de la inhibición de plk1 dado que en la literatura médica actual no hay publicaciones.

# **Hipótesis y objetivos**

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **1) Hipótesis**

La expresión inmunohistoquímica de PLK-1 es un factor predictor de respuesta y pronóstico en el cáncer colo-rectal metastásico en hígado.

### **2) Objetivos**

#### **1. Objetivo principal**

Valorar la significación pronóstica y predictora de respuesta a neoadyuvancia de la expresión inmunohistoquímica de PLK-1 en las muestras del tumor primario en pacientes con carcinoma colo-rectal metastásico.

#### **2. Objetivos secundarios**

- a. Describir de forma retrospectiva las características de la población de pacientes con cáncer colo-rectal metastásico hepático tratados con quimioterapia y resección quirúrgica en nuestro Centro.
- b. Identificar las características histológicas/clínicas del tumor primario y de las metástasis hepáticas con el objetivo de establecer factores de respuesta tumoral a neoadyuvancia.
- c. Valorar factores que determinan el pronóstico de los pacientes con cáncer colo-rectal metastásico tratados con neoadyuvancia.



# **Pacientes, material y métodos**

## PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Pacientes incluidos en el estudio

Se ha realizado una revisión retrospectiva las historias electrónicas y en papel de los pacientes tratados por cáncer colo-rectal en el Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz (Universidad Autónoma de Madrid, Madrid) entre enero 2000 y enero 2014. Se establecen como criterios de inclusión en el estudio aquellos pacientes con metástasis hepáticas que han recibido neoadyuvancia y posteriormente fueron sometidos a cirugía oncológica radical (R0) de sus metástasis hepáticas. Tras la cirugía todos los pacientes recibieron quimioterapia adyuvante según protocolo hospitalario.

Tabla 4. Criterios de inclusión

CRITERIOS DE INCLUSIÓN
Edad mayor ó igual a 18 años
Paciente con diagnóstico histológico de cáncer colo-rectal y metástasis hepáticas
Administración de quimioterapia neoadyuvante previa a la cirugía de las metástasis hepáticas
Cirugía R0 de metástasis hepáticas

### 2. Análisis del tejido tumoral

Para el análisis del tejido tumoral se incuyó la pieza quirúrgica de la primera resección hepática (ya que algunos pacientes fueron sometidos a metastasectomías ó hepatectomías repetidas por recaída hepática). En los casos de pacientes con múltiples metástasis hepáticas, se realizó un cálculo estimado de la carga tumoral cuantitativa mediante el valor medio del diámetro mayor de los distintos nódulos y una estimación del patrón predominante de respuesta como el valor medio para todos los nódulos.

El Servicio de Anatomía Patológica de la Fundación Jiménez Díaz (Madrid) realiza de rutina una inclusión en parafina de las lesiones hepáticas resecadas.

Se seleccionaron muestras de tejido fijadas en formol e incluidas en parafina (FFPE) de los tumores de colon y recto primarios y de las metástasis hepáticas en los mismos pacientes. Con estos tejidos se construyeron micromatrices de tejidos (TMA). Las zonas representativas del tejido tumoral eran identificadas por un patólogo en secciones teñidas con hematoxilina-eosina. Tras la revisión por el patólogo se ensamblaron los TMAs con núcleos de 0,6 mm por triplicado del tejido de las biopsias tumorales, utilizando una máquina para TMA MTA-1 (Beecher Instruments®). Toda la inmunohistoquímica se llevó a cabo en el Servicio de Anatomía Patológica de la Fundación Jiménez Díaz. La recuperación de antígenos se realizó en PT-Link (Dako®) durante 20 minutos a 95°C en una solución tamponada con elevado PH (Dako®). Se bloqueó la peroxidasa endógena mediante inmersión de las secciones en peróxido de hidrógeno durante 5 minutos. Los cortes fueron lavados durante 5 minutos con solución salina tamponada Tris que contenía Tween 20 con un PH de 7.6 e incubados con los anticuerpos primarios anti-PLK1 (Abcam) durante 20 minutos a temperatura ambiente, seguido de incubación con el polímero adecuado anti-Ig peroxidasa de rábano conjugada (EnVision Dako) para detectar la reacción antígeno-anticuerpo.

La reacción se reveló con 3,3'-diaminobencidina como cromógeno durante 5 minutos y contratiñó con hematoxilina. Todas las tinciones de inmunohistoquímica fueron realizadas en un Dako Autostainer. Las muestras de tejido FFPE de sujetos sanos fueron teñidas como controles positivos para PLK1 (de acuerdo con Human Protein Atlas en <http://www.proteinatlas.org>) La expresión de PLK1 se consideraba positiva cuando más del 10% de las células mostraban inmunoreactividad.

En aquellos casos con respuesta patológica completa, realizan cortes seriados y tinción de mucina, pero no se realiza inmunohistoquímica para buscar células positivas con citoqueratinas.

### **3. Variables analizadas**

#### **a. Variables demográficas y clínicas de los pacientes**

- i. Edad
- ii. Sexo
- iii. Comorbilidades
- iv. Antecedentes familiares de cáncer
- v. Antecedentes personales de cáncer
- vi. Localización del tumor primario
- vii. Estadio T tumor primario
  1. pTX: no se puede evaluar el tumor primario
  2. pT0: no hay evidencia de cáncer de colon o recto
  3. pTis: carcinoma in situ, intraepitelial (sin invasión de la lámina propia)
  4. pTis: carcinoma in situ, invasión de lámina propia/muscularis mucosae
  5. pT1: Tumor invade la submucosa
  6. pT2: Tumor invade la muscular propia
  7. pT3: El tumor crece a través de la muscular hasta los tejidos pericolónicos
  8. pT4a: El tumor invade el peritoneo visceral
  9. pT4b: El tumor invade otros órganos ó se ha adherido a ellos
- viii. Estadio N tumor primario
  1. pNx: No se puede evaluar la afectación ganglionar
  2. pN0: No hay metástasis en los ganglios regionales
  3. pN1a: Metástasis en 1 ganglio regional
  4. pN1b: metástasis en 2 ó 3 ganglios regionales
  5. pN1c: Depósito(s) tumoral(es) en la subserosa ó en los tejidos no peritonizados pericólicos ó peri-rectales sin metástasis ganglionares
  6. pN2a: Células tumorales en 4 a 6 ganglios linfáticos
  7. pN2b: Células tumorales en 7 ó más ganglios linfáticos

- ix. CEA en el momento del diagnóstico: Nivel de antígeno carcinoembrionario en sangre
- x. Respuesta histopatológica a la quimioterapia
- xi. Recaída: Reaparición del cáncer tras un periodo sin evidencia de enfermedad detectable.
  - 1. Loco-regional: En el mismo lugar donde se localizaba el tumor de origen
  - 2. A distancia ó metástasis: El tumor aparece en un órgano diferente al del tumor de origen
- xii. Tiempo hasta la recaída en meses (intervalo o supervivencia libre de progresión): Período de tiempo después del tratamiento primario de un cáncer durante el que el paciente sobrevive sin ningún signo o síntoma de que ese cáncer ha recaído
- xiii. Exitus
- xiv. Tiempo hasta fallecimiento a causa del tumor en meses (supervivencia global): Período de tiempo desde la fecha de diagnóstico o del inicio del tratamiento del cáncer, durante el que los pacientes diagnosticados con la enfermedad todavía están vivos

#### **b. Variables histopatológicas del tumor primario**

- i. Diferenciación
- ii. Localización
  - 1. Colon
  - 2. Recto
- iii. Invasión linfática
- iv. Reacción inflamatoria linfohistiocítica
- v. Desmoplasia
- vi. Producción de mucina
- vii. Frente de avance
- viii. Estadío pT
- ix. Estadío pN

### **c. Variables de las metástasis hepáticas**

#### **i. Respuesta morfológica a la neoadyuvancia, según los criterios de Blazer (44)**

1. A: Respuesta completa (0% tumor residual)
2. B: Respuesta mayor (1-49% células tumorales residuales)
3. C: Respuesta menor ( $\geq 50\%$  células tumorales residuales)

#### **ii. Respuesta morfológica a neoadyuvancia según los criterios de Rubbia-Brandt (45)**

1. TRG 1: ausencia de tumor residual y gran cantidad de fibrosis
2. TRG 2: escasas células tumorales dispersas entre la fibrosis
3. TRG 3: Mayor cantidad de células tumorales pero con predominio de la fibrosis
4. TRG 4: La cantidad de células tumorales predomina sobre la fibrosis
5. TRG 5: no hay signos de respuesta

#### **iii. Variables morfológicas metástasis hepática**

1. Invasión vascular: Definida como presencia de células tumorales en el interior de un vaso y adheridas a sus paredes. No se ha distinguido entre vasos sanguíneos y linfáticos
2. Invasión conductos biliares: Presencia de células en el espacio portal
3. Invasión parénquima hepático

4. Invasión perineural: Definida como la presencia de células tumorales bajo la cápsula fibrosa de un nervio
5. Satelitosis: Definida como presencia de nódulos metastásicos separados más de 1 mm del nódulo principal
6. Grado de diferenciación
  - a. Alto
  - b. Bajo
  - c. Mucinoso
7. Reacción inflamatoria en el nódulo tumoral
  - a. Intensa
  - b. Escasa
  - c. Ausente
8. Tipo de respuesta inflamatoria
  - a. Linfocitaria
  - b. Histiocitaria
  - c. Polinuclear
9. Espesor del tumor en la zona de interfase tumor-normal (TNI), según criterios de Maru y cols. (53)

#### **4. Análisis estadístico**

Se confirmó la normalidad de las variables cuantitativas con la prueba de Shapiro-Wilk/Kolmogorov-Smirnoff. El análisis se hizo en tres fases:

- Análisis descriptivo: Se realizó un análisis descriptivo de las distintas variables estudiadas. Para ello se emplearon porcentajes y frecuencias absolutas para las variables cualitativas y medias (desviación estándar) para las cuantitativas con distribución normal o mediana (rango intercuartílico) para las variables que no se ajustaban a la normalidad.
- Análisis univariable de asociación:
  - Xi cuadrado: variables cualitativas.

- Prueba t de Student o ANOVA: comparación de variables cuantitativas entre grupos de una cualitativa con dos categorías o más.
- Análisis de supervivencia:
  - Se hizo la comparación de las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier con la prueba del logaritmo de los rangos.

El nivel de significación estadística de todas las pruebas se estableció por convenio en un valor de  $p < 0,05$ . El procesamiento y análisis de los datos se realizó mediante el programa estadístico SPSS versión 20.

## **5. Aspectos éticos/Confidencialidad de los datos**

Se obtuvo el permiso del Comité de Ética para Investigaciones Científicas de nuestro hospital (abril 2014).

El estudio se llevó a cabo de acuerdo con los requerimientos expresados en la Declaración de Helsinki (revisión de Seúl, Octubre de 2008) así como la legislación vigente en España de acuerdo a lo dispuesto en la orden ministerial SAS/3470/2009, relativa a la realización de estudios observacionales. El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. Los datos del investigador y del estudio serán introducidos y tratados en una base de datos, que se tratará conforme a la mencionada la Ley Orgánica, exclusivamente para el desarrollo y buen fin del estudio.



# Resultados

## RESULTADOS

Se presentan a continuación los resultados de la serie analizada. Cincuenta pacientes cumplieron los criterios de inclusión. Sobre la serie se realizó un seguimiento medio de 55 meses (14-140).

Todos los pacientes recibieron neoadyuvancia para sus metástasis hepáticas, con un tratamiento basado en oxaliplatino y flupirimidinas, según los esquemas habituales de tratamiento. Un 18% de los pacientes recibieron además fármacos dirigidos (fundamentalmente anti-VEGF).

### 1. Resultados globales

#### a. Características demográficas pacientes

Tabla 5. Características demográficas de la serie de pacientes

	Porcentaje
Sexo	Varón 54% Mujer 46%
Edad * (años)	62,3 (11,3)
Comorbilidades	No 70% Si 30%
Antecedentes personales de cáncer	No 82% Si 18%
Antecedentes familiares de cáncer	No 74% Si 26%

\*Expresado como media (desviación estándar)

b. Datos evolutivos de los pacientes

Tabla 6. Parámetros de evolución de la serie de pacientes

	Porcentaje
Recaída (local y a distancia)	No 12% Si 88%
Supervivencia libre de progresión*	20,9 (14,3)
Fallecidos	No 36% Si 62% Perdidos 2%
Supervivencia global* (meses)	52,5 (36,5)

Expresado como media (desviación estándar)

c. Características generales tumorales

Tabla 7. Características generales tumorales

	Porcentaje
Localización tumor primario	Recto-sigma 66% Otros 44%
Estadio T tumor primario	T1 2% T2 10% T3 80% T4 8%
Estadio N tumor primario	N0 50% N1 30% N2 20%

d. Características analíticas pacientes

1. Nivel CEA preoperatorio

1. Mediana 5,00
2. Mínimo 0,3
3. Máximo 436

2. Nivel CA 19-9 preoperatorio

4. Mediana 14,50
5. Mínimo 1
6. Máximo 7000

**2. Influencia pronóstica y predictora de respuesta de PLK-1**

a) Relación de PLK1 y variables demográficas

No hemos encontrado ninguna asociación significativa entre la expresión de PLK-1 y las características demográficas de los pacientes

b) Expresión de PLK-1 en el tumor primario y en las metástasis

Como se ha comentado en la sección de métodos, la expresión de PLK1 se ha considerado positiva cuando más del 10% de las células presentaban inmunoreactividad. El 43% de los tumores primarios presentaban positividad para PLK-1, mientras que sólo el 23,5% de las metástasis hepáticas lo presentaban ( $p=0.05$ ). Además los tumores primarios que expresaban PLK-1 se localizaban con más frecuencia en el colon (64%) que en recto-sigma (32%) ( $p=0.02$ ). Lo mismo sucedía con la expresión de PLK-1 en las metástasis hepáticas, que era positiva en

el 35% de los casos cuando el tumor primario se localizaba en el colon, frente al 16% cuando el tumor primario se localizaba en recto-sigma (con un valor de  $p=0,16$ , esta diferencia no alcanzó la significación estadística)

c) Relación de PLK1 con las características histopatológicas del tumor primario

Encontramos una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de PLK-1 y el tipo de crecimiento en el frente de avance del tumor primario: El 72 % de los tumores que tenían un frente de avance de tipo compresivo mostraron expresión de PLK-1, frente al 33 % de los tumores con un frente de avance de tipo infiltrativo ( $p= 0,03$  en la prueba de Fisher).

d) Niveles de PLK1 y su relación con la respuesta

Encontramos una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de PLK-1 en las metástasis hepáticas y la respuesta a terapia, de forma que las metástasis hepáticas con expresión positiva de PLK-1 presentaron una respuesta histopatológica a neoadyuvancia de tipo menor según los criterios de Blazer. De hecho, en la serie ninguno de los 11 pacientes con elevada expresión de PLK-1 en la metástasis mostraron respuesta mayor a neoadyuvancia con un valor de  $p=0,02$  (prueba de  $\chi^2$ ). La siguiente tabla muestra la asociación entre la expresión de PLK-1 en la metástasis y la respuesta a la neoadyuvancia:

Tabla 8. Asociación entre expresión de PLK-1 en las metástasis hepáticas y respuesta a tratamiento

	<b>PLK-1 Negativo</b>	<b>PLK-1 Positivo</b>	<b>Total</b>
<b>Respuesta Menor</b>	23	11	34
<b>Respuesta Mayor</b>	13	0	13
<b>Total</b>	36	11	47

e) Niveles de PLK-1 y su asociación con la supervivencia

Nuestro estudio no ha permitido confirmar la significación pronóstica de la respuesta histopatológica en términos de SG y SLP (Tabla 9), como ha ocurrido en otros estudios. Sin embargo, al analizar la posible asociación entre los resultados de supervivencia y la expresión de PLK-1 en el primario y en las metástasis encontramos que la expresión PLK-1 en el tumor primario no tenía asociación estadísticamente significativa con SLP ni con SG, pero si se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la SG entre las metástasis que expresan PLK-1 (27,1 meses) y aquellas que no lo expresaban (59,7 meses) ( $p=0.000$ ; 95% CI: 16,1-48,9 meses), como muestran los datos de la tabla 10. Además esta significación pronóstica también la observamos al comparar las curvas de supervivencia de los grupos con la prueba del logaritmo de los rangos (Figura 3).

**Tabla 9.** Valor pronóstico de la respuesta histopatológica a neoadyuvancia con respecto a la supervivencia libre de progresión (SLP) y la supervivencia global (SG)

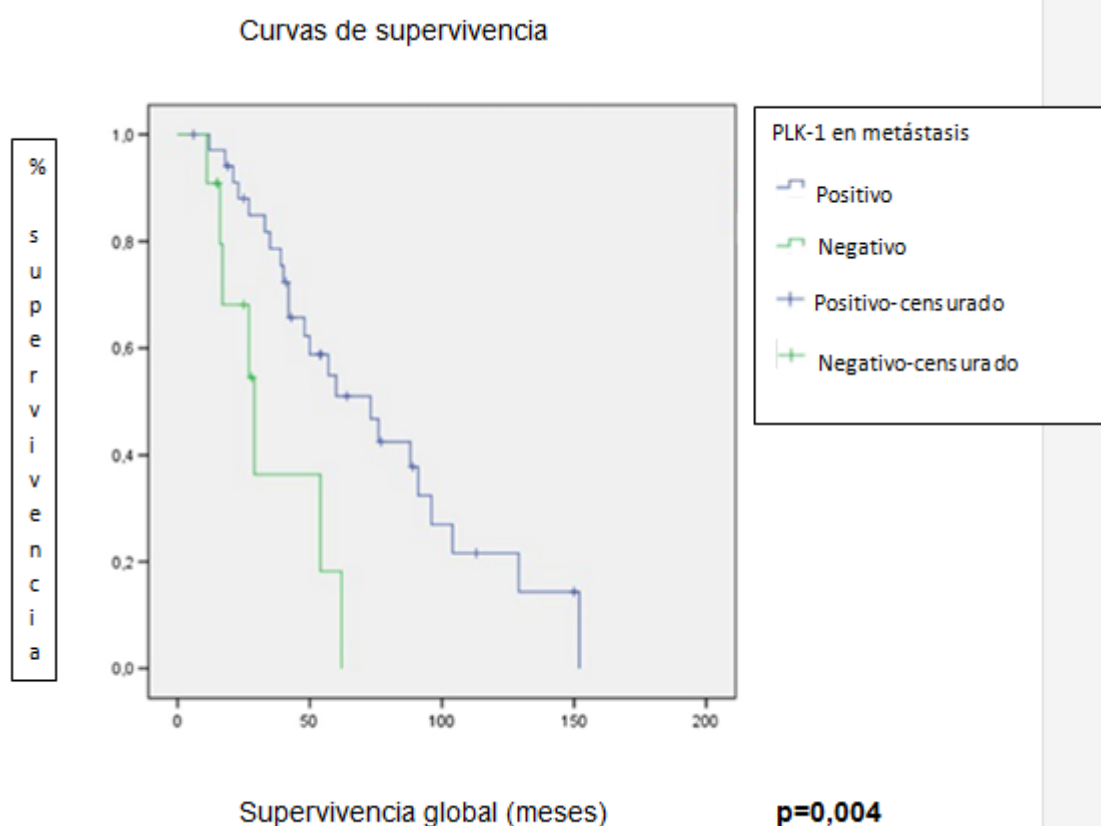
	SLP	Valor p	SG	Valor p
Respuesta a neoadyuvancia	Menor 20,22 Mayor 23	0,55	Menor 47,2 Mayor 54,4	0,58

**Tabla 10.** Asociación entre resultados de supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG) y la expresión de PLK-1 en el tumor primario y en las metástasis

	SLP	Valor de p	SG	Valor de p
Expresión PLK-1 en tumor primario	Negativa 19,9 Positiva 18,5	0,77	Negativa 51,7 Positiva 45	0,26
Expresión PLK-1 en metástasis hepática	Negativa 21,7 Positiva 16,8	0,55	Negativa 59,7 Positiva 27,1	0,00

Comparación de medias para los valores de SLP y SG en meses

Figura 13. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia global en las metástasis hepáticas con expresión positiva y negativa de PLK-1



### **3. Características que definen y se asocian con respuesta a neoadyuvancia**

#### **a. Variables clínicas y analíticas**

##### **i. Niveles de CEA**

El análisis estadístico de los factores que influyen en la respuesta se ha realizado con respecto a dos grupos: el grupo de los pacientes con respuesta mayor y los que presentaron respuesta menor.

Sólo encontramos diferencias estadísticamente significativas con respecto a los valores de CEA ( $p=0.01$ ), que eran significativamente superiores en los pacientes con respuesta menor.

Para el análisis subsiguiente clasificamos los pacientes en dos grupos, aquellos con valores de CEA menor o igual a 5 ng/ml y aquellos con niveles de



CEA mayores de 5 ng/ml. La siguiente tabla muestra los resultados de ese análisis.

Tabla 11. Análisis univariante: asociaciones estadísticamente significativas

	<b>Respuesta mayor</b>	<b>Respuesta menor</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Nivel de CEA</b>	≤5 ng/ml 6 (80%) >5 ng/ml 2 (20%)	≤ 5 ng/ml 1 (5%) >5 ng/ml 20 (95%)	0,001
<b>Diferenciación</b>	Bajo Grado 4 (31%) Alto Grado 9 (69%)	Bajo Grado 29 (85%) Alto Grado 5 (15%)	0,001

Finalmente, realizamos un modelo de regresión logística considerando todas las variables demográficas e histopatológicas que pudieran tener influencia en la respuesta y encontramos que sólo los niveles preoperatorios de CEA se relacionan de forma estadísticamente significativa con la respuesta de las metástasis hepáticas a neoadyuvancia ( $p=0,02$ ). El grado de diferenciación del tumor primario presenta una tendencia hacia la significación ( $p=0,07$ ), de modo que en los pacientes con tumores bien diferenciados las metástasis hepáticas tienden a responder peor a la neoadyuvancia que en los pacientes con tumores pobremente diferenciados. Estos resultados fueron publicados en la revista Pathology and Oncology Research en 2015 (54)

## **b. Variables histopatológicas del tumor primario**

Tabla 12. Características histopatológicas del tumor primario

	<b>Respuesta completa (n=3)*</b>	<b>Respuesta mayor (n=10)</b>	<b>Respuesta menor (n=34)*</b>
<b>Diferenciación</b>	Bajo grado 1 (50%) Alto grado 1 (50%)	Bajo grado 3 (30%) Alto grado 7 (70%)	Bajo grado 27 (84,5%) Alto grado 5 (15,5%)
<b>Localización</b>	Colon 0 Recto-Sigma 3 (100%)	Colon 3 (30%) Recto-Sigma 7 (70%)	Colon 13 (38%) Recto-Sigma 21 (62%)
<b>Infiltración Linfática</b>	Presente 0 Ausente 2 (100%)	Presente 1 (10%) Ausente 9 (90%)	Presente 8 (25%) Ausente 24 (75%)
<b>Reacción Inflamatoria Linfocitocitaria</b>	Ausente 1 (50%) Escasa 1 (50%) Intensa 2 (100%)	Ausente 5 (50%) Escasa 3 (30%) Intensa 2 (20%)	Ausente 17 (53%) Escasa 6 (19%) Intensa 9 (28%)
<b>Frente de Avance</b>	Compresivo 0 Infiltrativo 2 (100%)	Compresivo 3 (30%) Infiltrativo 7 (70%)	Compresivo 9 (28%) Infiltrativo 23 (72%)
<b>Desmoplasia</b>	Ausente 2 (100%) Presente 0	Ausente 7 (70%) Presente 3 (30%)	Ausente 28 (87,5%) Presente 4 (12,5%)
<b>Producción de Mucina</b>	Ausente 2 (100%) Presente 0	Ausente 10 (100%) Presente 0	Ausente 27 (84,4%) Presente 5 (15,6%)
<b>Estadio pT</b>	T1 0 T2 1 (33%) T3 2 (64%) T4 0	T1 1 (10%) T2 1 (10%) T3 7 (70%) T4 1 (10%)	T1 0 T2 2 (6%) T3 29 (85%) T4 3 (9%)
<b>Estadio pN</b>	N0 3 (100%) N1 N2	N0 4 (40%) N1 2 (20%) N2 4 (40%)	N0 15 (44%) N1 13 (38%) N2 6 (8%)

Los datos histopatológicos del primario se perdieron en un paciente del grupo de la respuesta completa y en dos del grupo de la respuesta menor

### **c. Variables de las metástasis hepáticas**

#### **i. Variables morfológicas metástasis hepáticas**

Para el propósito de este estudio construimos una curva operador-receptor para determinar el mejor punto de corte de las variables cuantitativas y utilizamos el valor calculado de 2,5 mm para dividir nuestra serie en dos grupos: Pacientes con grosor en la superficie de transición tumor-normal de las metástasis hepáticas menores ó igual a 2,5 mm (60%) y pacientes con grosor en dicha superficie de mayor tamaño.

#### **ii. Características histopatológicas de las metástasis hepáticas**

Tabla 13. Características histopatológicas de las metástasis hepáticas

<b>Característica</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>Diferenciación</b>	Bajo grado (bien-moderadamente diferenciado) 91% Alto grado (poco diferenciado) 9%
<b>Borde de la lesión</b>	Irregular 31% Liso (encapsulado) 69%
<b>Invasión vascular</b>	Ausente 70% Presente 30%
<b>Reacción inflamatoria linfohistiocítica</b>	Ausente 32% Escasa 49% Intensa 19%
<b>Células principales del infiltrado inflamatorio (n=35)</b>	Linfocitos-Histiocitos 83% Polimorfonucleares 17%
<b>Fibrosis</b>	Ausente 42,6% Presencia colágeno 27,7% Presencia desmoplasia 29,7%
<b>Mucina</b>	Ausente 76,6% Presente 23,4%

<b>Invasión perineural</b>	Ausente 96% Presente 4%
<b>Necrosis</b>	Ausente 24% Presente 76%
<b>Grosor en la superficie de transición tumor-normal</b>	$\leq 2,5$ mm 60% > 2,5 mm 40%
<b>Calcificación</b>	Ausente 88% Presente 12%
<b>Satelitosis</b>	Ausente 46,8 % Presente 53,2%

### **iii. Respuesta morfológica a la neoadyuvancia, según los criterios de Blazer**

Completa: 6 % pacientes

Mayor: 20 % pacientes

Menor: 68 % pacientes

### **iv. Factores asociados con la respuesta a neoadyuvancia de las metastásis hepáticas**

#### **1. Grosor de la superficie tumor-normal**

Como era esperable, el grosor en la superficie de transición tumor-normal (TNI) de las metastásis hepáticas presentó asociación significativa con el grado de regresión ( $p=0,03$ ) y lógicamente los tumores con respuesta mayor presentaban valores significativamente menores de este grosor. Más aún, el grosor en la superficie de transición tumor-normal presentaba una asociación significativa con la presencia de reacción inflamatoria ( $p=0,01$ ) y ningún tumor con TNI mayor de 2,5 mm presentó una respuesta inflamatoria importante, al contrario que el 32% de los tumores con TNI menor de 2,5 mm. No encontramos otras asociaciones significativas entre el grosor de TNI y otras variables histopatológicas.

## **2. Seudo-cápsula**

Existe una asociación significativa entre el grado de regresión y la presencia de seudo-cápsula en el tumor ( $p=0,009$ ), el 33% de las metástasis con seudo-cápsula presentaron respuesta mayor, mientras que ninguna de las metástasis con patrón de crecimiento infiltrante presentó respuesta mayor.

## **3. Respuesta inflamatoria**

La reacción inflamatoria fue más intensa en los casos con respuesta mayor a tratamiento ( $p=0,03$ ).

# **4. Análisis de los factores relacionados con la supervivencia**

### **a. Tumor primario**

Se observa una asociación significativa entre el estadio ganglionar y la supervivencia global (SG), siendo de 29,8 meses para los pacientes sin afectación metastásica ganglionar y de 16,5 meses para los pacientes con ganglios positivos ( $p= 0,004$ ).

### **b. Respuesta histopatológica**

En nuestro estudio no hemos podido confirmar la significación pronóstica de la respuesta histopatológica con respecto a la SG y SLP, como ha ocurrido en otros estudios.

Tabla 14. Valor pronóstico de la respuesta histopatológica a neoadyuvancia con respecto a la supervivencia libre de progresión (SLP) y la supervivencia global (SG)

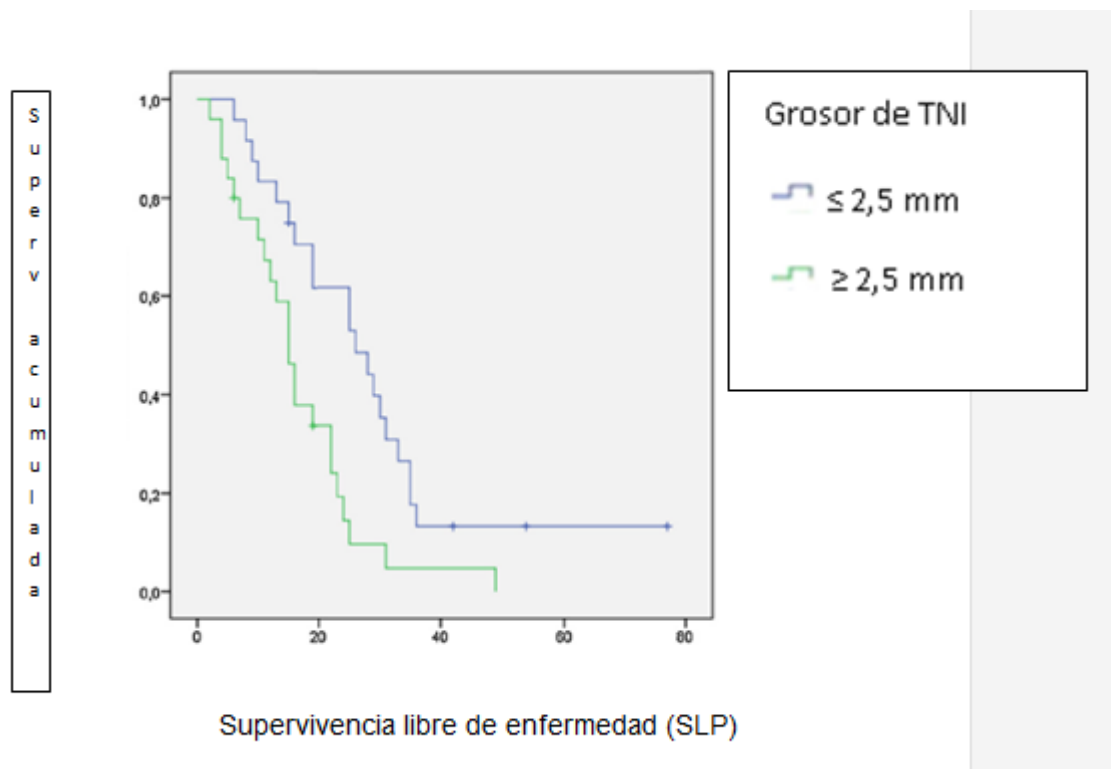
	SLP	Valor p	SG	Valor p
Respuesta a Neoadyuvancia	Menor 20,22	0,55	Negativa 47,2	0,58
	Mayor 23		Positiva 54,4	

### c. Factores relacionados con las metástasis hepáticas

#### i. TNI

Encontramos una asociación significativa entre TNI y supervivencia libre de progresión (SLP) ( $p=0,01$ ) y supervivencia global (SG) ( $p=0,05$ ).

Figura 14. Curvas de Kaplan-Meier comparando la supervivencia de pacientes con valores de TNI mayores de 2,5 mm y menores de 2,5 mm



La supervivencia global media de los pacientes con grosor de TNI menor ó igual a 2,5 mm fue de 77 meses, frente a los 54 meses de los pacientes con TNI mayor de 2,5 mm. Estos resultados fueron publicados en 2015. (55)

## ii.Fibrosis

La supervivencia global (SG) se relaciona en nuestra serie de forma estadísticamente significativa con la presencia de fibrosis en la metástasis hepática ( $p=0,04$ ). La supervivencia media de los pacientes sin fibrosis en la metástasis hepática fue 4,1 meses frente a los 7,1 meses de los pacientes con fibrosis colágena y 1,8 meses para los pacientes con desmoplasia.

## iii. Mucina

Encontramos una tendencia a la asociación negativa entre la supervivencia global y la presencia de lagos de mucina, cuando era la característica más relevante en la metástasis tras neoadyuvancia (23,5 meses frente a 15,8 meses  $p=0,07$ ).

## iv. Satelitos

También encontramos una asociación entre la presencia de satelitos y la supervivencia libre de progresión (SLP) ( $p=0,07$ ) ya que su presencia tiende a predecir una menor SLP.

# Discusión



## Discusión

### 1. Influencia pronóstica de PLK-1

Los resultados más interesantes de nuestra serie provienen del análisis de PLK1. Los tratamientos dirigidos de forma selectiva de pequeñas moléculas de la familia tirosin-kinasa son una opción terapéutica emergente en el manejo del cáncer (49). PLK-1 es una cinasa serina-treonina que juega un papel fundamental en el control de la formación del huso mitótico y en la citocinesis (56). Además PLK-1 es necesaria para la recuperación del punto de control G2. Se ha descrito que PLK-1 fosforila a Chk2 en el dominio FHA e impide su activación en la mitosis. (57)

Varios trabajos han publicado que PLK-1 tiene una expresión más baja, de forma significativa, en las células no transformadas, lo que la convierte en una diana muy interesante que puede ser antagonizada de forma selectiva en las células tumorales. De hecho la inhibición de PLK-1 ó su depleción basta para frenar el ciclo celular e inducir apoptosis en líneas celulares cancerígenas y en modelos tumorales xenograft (58). Se han publicado trabajos en los que se utilizan fármacos anti-PLK1 como Volasertib para tratar leucemia (59) y tumores sólidos (60); así como ensayos de fase I con inhibidores intravenosos (61) y orales (62) con resultados muy prometedores.

No obstante en la fecha en la que realizamos nuestros trabajos no se había publicado sobre la influencia pronostica de la expresión de PLK-1 en el cáncer colorrectal metastático y el presente estudio describe la significación de PLK1 en carcinoma colorrectal metastásico como factor pronóstico y predictor de respuesta a tratamiento quimioterápico . Es cierto que el tratamiento de las metástasis hepáticas de origen colorrectal ha evolucionado en los últimos años y actualmente la resección quirúrgica complementado con un tratamiento de quimioterapia sistémica es la opción estándar. Sin embargo, estos pacientes suelen presentar recaída ó progresión y muchos fallecen por esta enfermedad.

No hemos encontrado ninguna asociación significativa entre la expresión de PLK-1 y las característica demográficas de los pacientes.

En nuestro estudio primero comparamos la expresión de PLK1 (que hemos considerado positiva cuando más del 10% de las células presentaban inmunoreactividad) entre el tumor primario y las metástasis y observamos una disminución significativa de la expresión en las metástasis. De hecho, el 43% de los tumores primarios presentaban positividad para la expresión inmunohistoquímica de PLK-1, mientras que sólo el 23,5% de las metástasis hepáticas lo presentaban ( $p=0.05$ ). Este fenómeno puede deberse a un cambio en el fenotipo de la metástasis con respecto al primario o bien al efecto de la quimioterapia neoadyuvante.

También era más frecuente la expresión de PLK-1 en los tumores primarios que se localizaban en el colon (64%) que en recto-sigma (32%) ( $p=0.02$ ). Lo mismo sucedía con la expresión de PLK-1 en las metástasis hepáticas, que era positiva en el 35% de los casos cuando el tumor primario se localizaba en el colon, frente al 16% cuando el tumor primario se localizaba en recto-sigma (A pesar de un valor de  $p=0.16$ , esta diferencia no alcanzó la significación estadística)

Al analizar la relación entre las características histopatológicas y la expresión de PLK-1 encontramos una asociación estadísticamente significativa. El 72 % de los tumores que tenían un frente de avance de tipo compresivo mostraron expresión de PLK-1, frente al 33 % de los tumores con un frente de avance de tipo infiltrativo ( $p=0.03$  en el Test de Fisher).

Los 50 pacientes de nuestro estudio recibieron neoadyuvancia antes de la resección hepática con esquema convencional de quimioterapia asociado no a anti-EFG y anti-VEGF y encontramos una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de PLK-1 en las metástasis hepáticas y la respuesta a tratamiento, los pacientes con expresión positiva de PLK-1 en las metástasis hepáticas presentaron una respuesta histopatológica a neoadyuvancia de tipo menor según los criterios de Blazer. Es un hecho muy remarcable que en nuestra serie ninguno de los 11 pacientes con elevada expresión de PLK-1 en la metástasis mostraron respuesta mayor a neoadyuvancia con un valor de  $p=0,02$ ; de modo que podemos afirmar que según nuestros resultados una elevada expresión de PLK-1 en las metástasis hepáticas se asocia a mala respuesta a quimioterapia neoadyuvante. Este resultado es interesante y

convendría reproducirlo en series de mayor tamaño por sus implicaciones de cara a la indicación de neoadyuvancia o intentar cirugía de entrada de las metástasis hepáticas de estos pacientes por el riesgo de ausencia de respuesta al tratamiento o progresión durante el mismo.

Sin embargo no hemos podido confirmar la significación pronóstica de la respuesta histopatológica con respecto a la SG y SLP, como ha ocurrido en otros estudios. La expresión PLK-1 en el tumor primario no tenía asociación estadísticamente significativa con SLP ni con SG; pero sí que encontramos una diferencia estadísticamente significativa en la SG entre las metástasis que expresan PLK-1 (27,1 meses) y aquellas que no lo expresaban (59,7 meses) ( $p=0.000$ ; IC al 95% 16,1-48,9 meses). Además esta significación pronóstica también la observamos al comparar las curvas de supervivencia de los grupos con la prueba del logaritmo de los rangos. Por tanto, nuestro estudio demuestra una asociación significativa entre la expresión de PLK1 en las metástasis y la supervivencia global (SG) siendo un factor de mal pronóstico la expresión de PLK-1 en las metástasis hepáticas. Estos resultados se reflejan en nuestra publicación en Pathology & Oncology Research, 2016 (64).

Un estudio reciente sobre la expresión de PLK-1 en cáncer de recto concluyó que los pacientes con baja expresión de PLK-1 en el primario presentaban peor respuesta a quimio-radioterapia neoadyuvante y menor supervivencia libre de progresión, demostrando nuevamente las importantes diferencias moleculares y clínico-patológicas entre el cáncer de colon y el de recto (65).

Si en el futuro estudios en líneas celulares de tumores humanos y ensayos clínicos confirman la eficacia de algunos antagonistas selectivos de PLK1 para controlar el crecimiento e inducir apoptosis en el cáncer colo-rectal (siguiendo la forma en que se ha demostrado clínica y experimentalmente en la leucemia (66), estos fármacos pueden convertirse en una opción complementaria de la terapia adyuvante en el cáncer colo-rectal metastásico. Nuestros resultados muestran que la expresión de PLK1 en las metástasis predice una respuesta menor a la neoadyuvancia con un peor pronóstico de estos pacientes, por eso la opción de poder controlar la actividad de esta molécula puede convertirse en una herramienta terapéutica muy interesante en

pacientes con cáncer colo-rectal metastásico en hígado, frente a la terapia convencional. Además estos resultados son independientes de la utilización de anti-EGF ó anti-VEGF en el análisis estratificado de subgrupos.

## 2. Características demográficas de la serie

Los datos demográficos de nuestra serie son muy similares a los de otras de mayor tamaño de la literatura (25) en cuanto a edad media de los pacientes (62,3 años) y sexo (54% de varones), dado que en la mayoría de las series predominan los varones con mayores o menores diferencias. El 70% de los pacientes no presentaba comorbilidades y del otro 30% la mayoría presentaba patología crónica controlada con tratamiento médico como hipertensión o diabetes y menos de un 10% tenía patología renal o cardíaca importante, ya que todos los pacientes de la serie eran candidatos a quimioterapia neoadyuvante y cirugía.

El 18% tenía historia oncológica previa debido a otro tumor y un 26% tenía antecedentes familiares de cáncer.

El seguimiento medio fue de 55 meses. Un 88% de los pacientes presentó progresión o recaída de su enfermedad, de los cuales un 40% fue sometido a una nueva resección hepática. El tiempo libre de enfermedad hasta recaída o progresión fue de 20,9 meses y la supervivencia global fue de 52'5 meses. En el último análisis el 36% de los pacientes estaban vivos.

En cuanto al tumor primario el 66% se localizaban en recto-sigma (el 28% en recto, siendo más acorde este dato con otras grandes series). Con un 80% de los pacientes pT3 y un 8% pT4, dato muy similar a otras series, al igual que la afectación ganglionar con un 50% N0, un 30% N1 y un 20% N2.

En cuanto a los niveles de CEA preoperatorio aunque en otras series más del 60% de los pacientes lo tienen elevado, en la nuestra solo un 40% de los pacientes lo presentaban. La mayoría de nuestros pacientes tenían valores normales de CA 19-9.

### 3.Respuesta a neoadyuvancia de las metástasis

Debido a que casi el 50% de los pacientes con cáncer colo-rectal desarrollan metástasis durante su seguimiento, es necesario diseñar estrategias terapéuticas agresivas para disminuir la carga de enfermedad y aumentar la supervivencia de estos pacientes, por eso es importante mejorar la respuesta de la enfermedad sistémica mediante quimioterapia y fármacos dirigidos (30).

Oncólogos y cirujanos admiten como la mejor opción de tratamiento la resección R0 de las metástasis hepáticas (13,67), no obstante en ocasiones el volumen o la distribución de las lesiones hace técnicamente muy compleja e incluso inviable la adecuada extirpación de las mismas, en estos pacientes se plantea como una opción la administración de neoadyuvancia sistémica (68), habitualmente con un esquema basado en oxaliplatino, irinotecán o una combinación de los mismos, asociando en cualquier caso fluoropirimidinas y pudiendo añadir fármacos dirigidos (anti-EGF y anti-VEGF). Para valorar la respuesta a la neoadyuvancia se suele realizar TAC, ante una progresión, se plantea un cambio en el esquema de quimioterapia o la enfermedad puede convertirse definitivamente en irresecable, a pesar de que es bien conocido que los criterios RECIST, que se basan en la reducción de tamaño de las lesiones, no se correlacionan adecuadamente con la respuesta histopatológica (69) ni predicen el pronóstico tras la resección quirúrgica. Por eso los radiólogos han desarrollado los llamados “criterios morfológicos” (66) (70), que parecen correlacionarse mejor con la respuesta histopatológica.

No hay un consenso claro en la literatura patológica sobre los datos esenciales que deben incluirse en un informe anatomopatológico de las metástasis hepáticas. En la actualidad, la mayoría de los patólogos incluyen el número, el tamaño de los nódulos y la distancia al borde de resección quirúrgica como las principales características para guiar el pronóstico y el tratamiento. Que la resección sea R0 es una de los marcadores pronósticos más importantes. Sin embargo, ha habido mucha discusión acerca de lo que puede considerarse un margen seguro. Varios estudios han confirmado la presencia de satelitos (metástasis microscópicas lejos de los principales nódulos de radiológicamente visibles) en las muestras de resección de las metástasis hepáticas. Si los cirujanos no resecamos completamente estos nódulos, puede producirse una

recaída temprana del tumor en el lecho de resección. Un estudio (71) mostró que la densidad de micrometástasis era mayor en la zona situada a menos de 1 cm del nódulo tumoral principal y esto llevó a la recomendación de un margen de 1 cm libre para mejorar la supervivencia. Sin embargo, informes recientes indican que 4 mm puede ser un margen lo suficientemente seguro, sobre todo si se administra terapia adyuvante después de la cirugía (72). Si la resección es técnicamente factible, el margen debería ser tan amplio como sea posible, pero en los casos técnicamente más complejos, es probable que sea posible obtener resultados similares cuando tras una resección R1 se administra quimioterapia adyuvante. El presente estudio ha incluido sólo casos con resección completa de nódulos metastásicos.

Los patólogos han desarrollado escalas de regresión o respuesta tumoral, de la misma manera que se hace para la valorar la respuesta a neoadyuvancia de el tumor primario. Al menos cinco publicaciones (44,45, 72) analizan la influencia pronóstica del grado de regresión de las metástasis hepáticas después de NAC, y todos ellos han confirmado que la respuesta mayor predice un mejor pronóstico. Sin embargo, los criterios utilizados para definir la respuesta no han sido homogéneos entre los diferentes grupos. Rubbia-Brandt describió inicialmente un sistema de cinco niveles para evaluar la respuesta, pero ella lleva a cabo su análisis comparando sólo tres grados (45). En la mayoría de los informes, no queda completamente claro si los patólogos analizan toda la muestra de los nódulos metastásicos y la forma en que se analiza la presencia de metástasis múltiples. Todos estos aspectos son fundamentales, sobre todo si consideramos el caso como una respuesta completa. No realizar una inclusión de toda la muestra podría dar lugar a confusión en casos considerados como respuesta completa ó dejar de valorara áreas con peor respuesta. No es infrecuente encontrar una respuesta importante en los nódulos mayores y una respuesta menor en las lesiones más pequeñas, ésto debe ser claramente registrado en el informe anatomopatológico y reflejado de forma específica en las publicaciones sobre este tema. En nuestro estudio, no se encontró heterogeneidad significativa entre los nódulos (sólo el 4% de los casos mostró). Algunos autores informan la respuesta en las metástasis empleando los mismos criterios que para la respuesta del tumor primario (72), es decir, básicamente reportan el porcentaje relativo entre las células tumorales viables y fibrosis. Estos sistemas basados en criterios más bien subjetivos pueden ser difíciles de reproducir, y dependen en gran medida de la experiencia de los patólogos.

Parece razonable que los patólogos incluyan en su análisis todos los nódulos metastásicos, haciendo cortes seriados especialmente en los casos de respuesta completa (como se ha propuesto para valorar el grado de respuesta tras neoadyuvancia en los tumores gástricos), y que utilicen los sistemas de clasificación de respuesta más objetivos. En este sentido, el sistema propuesto por Blazer et al. que incluye respuesta completa (ausencia total de las células tumorales), respuesta mayor (menos de 50% de células tumorales) y la respuesta menor (más de 50% de las células tumorales) parece ser un esquema más reproducible, además estos autores han confirmado su utilidad pronóstica (44). En nuestra serie el 6% de los pacientes presentaban respuesta completa, un 20% respuesta mayor y un 68% respuesta menor.

En nuestro estudio tres factores se han asociado con la respuesta a neoadyuvancia de las metástasis hepáticas: El grosor de la superficie tumor-normal, la presencia de pseudocápsula y la respuesta inflamatoria.

Como era esperable, el grosor en la superficie de transición tumor-normal (TNI) de las metástasis hepáticas presentó asociación significativa con el grado de regresión ( $p=0,03$ ) y lógicamente los tumores con respuesta mayor presentaban valores significativamente menores de este grosor. Más aún, el grosor en la superficie de transición tumor-normal presentaba una asociación significativa con la presencia de reacción inflamatoria ( $p=0,01$ ) y ningún tumor con TNI mayor de 2,5 mm presentó una respuesta inflamatoria importante, al contrario que el 32% de los tumores con TNI menor de 2,5 mm. No encontramos otras asociaciones significativas entre el grosor de TNI y otras variables histopatológicas. Estos resultados coinciden con los publicados por Maru y cols. y confirmados en una serie previa por nuestro grupo (Fdez-Aceñero y cols.)

Encontramos una asociación significativa entre el grado de regresión y la presencia de pseudo-cápsula en el tumor ( $p=0,009$ ). Un 33% de las metástasis con pseudo-cápsula presentaron respuesta mayor, mientras que ninguna de las metástasis con patrón de crecimiento infiltrante presentó respuesta mayor. El 70% de nuestros pacientes presentó pseudo-cápsula en sus metástasis, dato que concuerda con lo publicado por otras series (73)

La reacción inflamatoria fue más intensa en los casos con respuesta mayor a terapia ( $p=0,03$ ). Este resultado confirma la importancia del sistema inmune en el

pronóstico de las neoplasias, hecho que incluso se está aprovechando con fines terapéuticos en las novedosas terapias frente a PDL1.

#### 4. Factores pronósticos en cáncer colo-rectal metastásico

La Sociedad Española de Patología (74) elaboró recientemente un documento de consenso, que incluye todos estos aspectos para la manipulación de las muestras y la realización de informes de las metastásicas hepáticas. El tejido tumoral metastásico de origen colo-rectal puede extenderse de distintas formas en el hígado. Puede invadir venas, vasos linfáticos y también los conductos biliares. Estos patrones de distribución, no están claramente diferenciados en la literatura mundial, y en algunos informes, incluso hay cierta confusión entre satelitosis y diseminación intrahepática (75), lo que puede dificultar la comparación de los resultados de los diferentes grupos. En nuestro análisis la presencia de satelitosis tiende a asociarse con una SLP más corta. Este resultado coincide con otros trabajos publicados que muestran que satelitosis se asocia significativamente una mayor tasa de recaída local y también a una menor supervivencia (75)

Además, la mayoría de los informes han sido muestras teñidas con hematoxilina-eosina, lo que no permiten una adecuada distinción entre las venas y vasos linfáticos. Hasta la fecha, un único trabajo ha aplicado técnicas de inmunohistoquímica con D2-40 (podoplanina) para determinar el patrón exacto propagación. Una revisión reciente de la literatura (72) indica que la invasión de la vena portal está asociada con una peor supervivencia global, pero esto no ha sido demostrado para la invasión de las venas hepáticas. En una revisión previa, el 12% de los 170 pacientes que presentaron invasión linfática tenían de forma estadísticamente significativa, un peor pronóstico en términos de supervivencia. En la nuestra serie de 50 pacientes, no encontramos ninguna asociación significativa entre la invasión vascular y el pronóstico en términos de supervivencia libre de progresión, sin diferenciar en nuestro análisis entre invasión de vasos linfáticos y venas.

La invasión perineural es otra forma de diseminación tumoral, dentro y fuera del hígado. Pocas series han analizado este factor, pero en un trabajo de Yamamoto et al. se confirmó que la invasión perineural se asoció significativamente con un peor



pronóstico (75) .La tasa de invasión perineural en este informe fue del 14%, muy por encima del 4 % que encontramos en nuestra serie. Nuestro estudio no puede confirmar esta influencia pronostica de la invasión perineural, pero el resultado está limitado debido a la tasa más baja de este hallazgo.

Algunos autores han analizado el significado pronóstico de la pseudocápsula fibrosa alrededor de las metástasis. Los resultados de Okano y cols. (73) indican que una cápsula gruesa se asocia de forma significativa con una mejoría en la supervivencia a los 5 años (88% vs. 31% de los pacientes sin pseudocápsula). Estos autores encontraron pseudocápsula fibroso en el 61% de los casos, una tasa que es similar a la de nuestra serie (70%). La supervivencia a 5 años en pacientes con una pseudocápsula en nuestra serie fue del 73% frente al 54% sin lesión encapsulada, una diferencia que no alcanzó significación estadística, probablemente debido a la pequeña muestra.

En nuestro estudio, la necrosis fue el hallazgo histopatológico más frecuente en los tumores hepáticos después de neoadyuvancia. Sin embargo, es muy difícil determinar si esta necrosis verdaderamente representa respuesta al tratamiento o es sólo un signo de rápido crecimiento del tumor. De hecho, muchas metástasis no tratadas muestran una extensa necrosis. Lin-Chang y cols. (76) distingue entre la necrosis asociada a la respuesta a neoadyuvancia (debida a la inducción de la apoptosis de las células tumorales) y la necrosis asociada a la isquemia, que se puede encontrar en muestras de pacientes no tratados. Sin embargo, la presencia de necrosis se considera como un marcador de respuesta importante en muchos sistemas de clasificación, aunque realmente no es fácil asegurar que la necrosis es realmente por respuesta al tratamiento. En nuestro estudio, la presencia de necrosis no se asoció de forma estadísticamente significativa con el pronóstico.

Pocos estudios han analizado específicamente la presencia de la fibrosis después de la neoadyuvancia. En nuestra serie, se encontró que los pacientes con fibrosis colágena mostraron una mejora significativa de su pronóstico frente a los pacientes sin fibrosis e incluso mejor que los pacientes con desmoplasia.

La desmoplasia también puede encontrarse presente en los tumores primarios colo-rectales y se considera un signo de mal pronóstico (77), pero hasta la fecha, ningún informe ha demostrado posible influencia pronóstica en la metástasis. Hay una

tendencia a considerar la fibrosis como un signo de la respuesta del tumor al tratamiento, pero esto es sólo en el caso de la fibrosis colágena poco celular, no cuando nos encontramos con desmoplasia.

Pocos trabajos han examinado la influencia pronostica de la mucina en el tumor, pero los sistemas de clasificación suelen tener en cuenta que la presencia de lagos de mucina con pocas células tumorales es sugestiva de importante motivo de respuesta y, por tanto, indica un mejor pronóstico. Así es también en el caso de los sistemas de regresión para los tumores primarios, si sólo persisten lagos de mucina, la respuesta debería ser clasificada como completa. En nuestro conocimiento, nuestro trabajo es el primero en analizar de forma específica la influencia pronóstica de la presencia de mucina en el lecho tumoral después de neoadyuvancia. Hemos encontrado que si la característica histopatológica predominante después de la neoadyuvancia son los lagos de mucina, el pronóstico de los pacientes es significativamente peor independientemente del grado de regresión. En nuestra serie, ninguno de los tumores primarios eran carcinomas coloidales en anillo de sello secretores de mucina (todos los tumores primarios eran adenocarcinomas de patrón enteroide). Se podría argumentar que al igual que sucede con los tumores primarios, la producción de mucina indica un comportamiento biológico más agresivo. Sin embargo, esto no ha sido demostrado para la metástasis y nuestros resultados deben ser confirmados por estudios de mayor tamaño.

Tampoco ningún trabajo ha analizado de forma específica la posible influencia pronóstica de la reacción inflamatoria en los nódulos hepáticos metastásicos. Como es bien sabido, la respuesta linfocítica intratumoral en los carcinomas colo-rectales es una señal de mejor pronóstico, así como también la presencia de eosinófilos (78), por tanto la respuesta inflamatoria también debe incluirse en los informes de patología del carcinoma colo-rectal. En nuestra serie, sólo encontramos una asociación estadísticamente significativa entre reacción inflamatoria y TNI, pero ninguna asociación estadísticamente significativa con el pronóstico. En nuestro estudio, también se midió la influencia pronóstica del TNI, un factor que fue reportado por primera vez por Maru y col . en 2010 (53) y confirmada posteriormente en una pequeña serie de casos de nuestro grupo (80) y en una gran revisión por Brouquet (74). En este estudio, hemos aumentado el número de casos y como hemos comentado confirmamos que un valor de TNI por encima de los 2,5 mm se asocia significativamente con una menor

SLP. Además, como hemos reflejado anteriormente, hemos observado la asociación entre este factor y la respuesta al tratamiento. El punto de corte varía entre los diferentes grupos de trabajo, así que por el momento, si este factor se incluye en el informe anatomopatológico es mejor que sea reflejado como un dato cuantitativo en milímetros.

A pesar del tamaño muestral de nuestro estudio y de que sólo hemos realizado un análisis univariante de los datos histopatológicos hemos obtenido algunos resultados estadísticamente significativos que deberían ser confirmados por estudios posteriores. Además hemos asumido que los cambios observados son debidos a la neoadyuvancia.

Hasta la fecha, no se han publicado trabajos comparando los cambios que pueden ocurrir espontáneamente en los nódulos metastásicos con los inducidos por tratamiento. Podemos encontrar reacción inflamatoria, lagos de mucina y necrosis en las muestras tumorales sin ninguna intervención terapéutica. Sería muy interesante llevar a cabo estudios comparativos de la metástasis en pacientes tratados y no tratados para hacer frente a este problema definitivamente.

A pesar de estos resultados, nuestro estudio presenta algunas limitaciones que merecen ser mencionadas. Sin duda el más importante es el número de casos. A pesar de nuestra pequeña serie de 50 pacientes, podemos considerar tras su análisis que los pacientes son homogéneos y una muestra representativa del manejo estándar del cáncer colo-rectal con metástasis hepáticas en los países desarrollados. Así mismo, a pesar del tamaño de la serie, hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas que deberían ser confirmadas por estudios más amplios. Desde luego el carácter retrospectivo de este estudio es otra limitación. Sin duda son necesarios estudios más potentes que tengan en cuenta otros factores que pueden influir la respuesta a la neoadyuvancia y el pronóstico, como por ejemplo los niveles de CEA y la afectación ganglionar, que no hemos podido analizar debido a nuestro tamaño muestral. Esto también nos ha dificultado valorar la influencia de la localización en colon o recto del tumor. Nuestros resultados deberían ser confirmados por estudios prospectivos.

# Conclusiones

## Conclusiones

1. La expresión inmunohistoquímica de PLK-1 en las metástasis hepáticas es un factor predictor de respuesta a quimioterapia neoadyuvante y pronóstico en el carcinoma colo-rectal metastásico.
2. Existe una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de PLK-1 en las metástasis hepáticas y la respuesta a tratamiento con quimioterapia neoadyuvante. Los pacientes con expresión positiva de PLK-1 en las metástasis hepáticas presentaron una respuesta histopatológica a neoadyuvancia de tipo menor según los criterios de Blazer.
3. Se han identificado en el análisis multivariante los siguientes factores que se asocian de forma significativa a una mejor respuesta a neoadyuvancia: menor grosor de la superficie tumor-normal, la presencia de pseudocápsula, la respuesta inflamatoria y la fibrosis colágena.
4. Se han identificado en el análisis multivariante los siguientes factores que se asocian de forma significativa a peor respuesta a neoadyuvancia: La presencia de mucina y de satelitos.
5. Durante el seguimiento de los pacientes se ha observado una mayor supervivencia global en aquellos tumores que presentaban menor grosor de la superficie de transición tumor-normal y fibrosis colágena tras neoadyuvancia.
6. Durante el seguimiento de los pacientes se ha observado una menor supervivencia en aquellos tumores con satelitos y presencia de lagos de mucina tras neoadyuvancia.
7. La expresión de PLK-1 en las metástasis hepáticas es un factor de mal pronóstico, asociándose de forma significativa a una menor supervivencia global.

# Referencias

## Referencias

1. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin*. 2011; 61: 212-36.
2. López-Abente G, Ardanaz E, Torrella-Ramos A., Mateos A., Delgado-Sanz C, Chirlaque MD. Changes in colorectal cancer incidence and mortality trends in Spain. *Ann Oncol* 2010; 21 (Supl 3): iii76-82
3. Colorectal Cancer 2011 Report. World Cancer Research Fund/ American Institute for Cancer Research.
4. Winawer, S. J. Natural history of colorectal cancer. *The American journal of medicine* 1999; 106(1), 3-6.
5. Penna C, Nordlinger B. Colorectal metastasis (liver and lung). *Surg Clin North Am*. 2002 ;82(5):1075-90.
6. Penna C. Prise en charge des patients ayant un cancer du foie: les métastases hépatiques des cancers colorectaux. *Bull Cancer*. 2003;90(1):79-83
7. Manfredi S, Lepage C, Hatem C, Coatmeur O, Faivre J, Bouvier A-M. Epidemiology and Management of Liver Metastases From Colorectal Cancer. *Ann Surg*. 2006;244(2):254-9.
8. Figueras J, Torras J, Valls C, Ramos E, Lama C, Busquets J, Lladó L, Rafecas A, Fabregat J, Serrano T, López S, Martí-Rague S, Jaurrieta E. Resección de metástasis hepáticas de carcinoma colorrectal. Índice de reseccabilidad y supervivencia a largo plazo *Cir. Esp. (Ed. impr.)* 2001; 70(1): 27-33
9. Scheele J, Stangl R, Altendorf-Hoffman A. Hepatic metastases from colorectal carcinoma: Impact of surgical resection on the natural history.. *Br J Surg* 1990; 77(11), 1241-1246
10. Torras J, Valls C, Figueras J, Ramos E, Lama C, Busquets J et al. Resección de metástasis hepáticas de carcinoma colorrectal. Índice de reseccabilidad y supervivencia a largo plazo. *Cir Esp* 2001; 70: 27-33
11. Villar JM, Ramia JM, Mansilla A, Garcia C, Garrote D, Ferron JA. Resultados de la resección hepática con intención curativa por metástasis de carcinoma colorrectal. *Cir Esp* 2004;76(6):363-8

12. Ryosuke A, Nobuya Y, Bunzo N, Kenjiro K, Masakazu Y, Masaichi O. A prognostic indicator for the resection of liver metastasis of colorectal cancer.. Surg Today.2014; 44: 1287-1292
- 13.Pawlik TM, Scoggins CR, Zorzi D, Abdalla EK, Andres A, Eng C et al. Effect of Surgical Margin Status on Survival and Site of Recurrence After Hepatic Resection for Colorectal Metastases. Ann Surg. 2005 May; 241(5): 715–724
- 14.Ramia JM, Figueras J, De la Plaza R, García-Parreño J. Resección de metástasis hepáticas en presencia de enfermedad extrahepática.. Cir Esp. 2012; 90 (8): 483-489
- 15.Lam VW, Spiro C, Laurence JM, et al. A systematic review of clinical response and survival outcomes of downsizing systemic chemotherapy and rescue liver surgery in patients with initially unresectable colorectal liver metastases. Ann Surg Oncol 2012;19:1292–1301
- 16.Lykoudis PM, O'Reilly D, Nastos K, Fusai G. Systematic review of surgical management of synchronous colorectal liver metastases. Br J Surg 2014;101:605–612.
- 17.Moug SJ, Smith D, Leen E, Roxburgh C, Horgan PG. Evidence for a synchronous operative approach in the treatment of colorectal cancer with hepatic metastases: a case matched study. Eur J Surg Oncol 2010;36:365–370
- 18.Chua HK, Sondenaa K, Tsiotos GG, Larson DR, Wolff BG, Nagorney DM. Concurrent vs. staged colectomy and hepatectomy for primary colorectal cancer with synchronous hepatic metastases. Dis Colon Rectum 2004;47:1310–1316.
- 19.Mentha G, Majno PE, Andres A, Rubbia-Brandt L, Morel P, Roth AD. Neoadjuvant chemotherapy and resection of advanced synchronous liver metastases before treatment of the colorectal primary. Br J Surg 2006;93:872–878.
- 20.Adam R, Hoti E, Bredt LC. Estrategias oncoquirúrgicas en el cáncer hepático metastásico. Cir Esp. 2011; 89 (1):10-19
- 21.Adam R, Laurent A, Azoulay D,Castaing D, Bismuth H. Two-Stage Hepatectomy: A Planned Strategy to Treat Irresectable Liver Tumors. Ann Surg: 2000 Dec; 232(6): 777–785.
- 22.Azoulay D, Eshkenazy R, Andreani P, Castaing D, Adam R, Ichai P, et al. In situ hypothermic perfusion of the liver versus standart total vascular exclusion for major liver resection. A controlled study. Ann Surg. 1996;224:155–61



23. Azoulay D, Andreani P, Maggi U, Salloum C, Perdigao F, Sebagh M, et al. Combined liver resection and reconstruction of the supra-renal vena cava: the Paul Brousse experience. *Ann Surg.* 2006;244:80–8.
24. Maggiori L, Goere D, Viana B, Tzanis D, Dumont F, Honore Ch, Eveno C, Elias D. Should Patients With Peritoneal Carcinomatosis of Colorectal Origin With Synchronous Liver Metastases Be Treated With a Curative Intent? A Case-Control Study. *Ann Surg* 2013;258: 116–121
25. Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B, Poston GJ, Schlag PM, Rougier P, et al; EORTC Gastro-Intestinal Tract Cancer Group; Cancer Research UK; Arbeitsgruppe Lebermetastasen und-tumoren in der Chirurgischen Arbeitsgemeinschaft Onkologie (ALM-CAO); Australasian Gastro-Intestinal Trials Group (AGITG); Fédération Francophone de Cancérologie Digestive (FFCD). Perioperative chemotherapy with FOLFOX4 and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC Intergroup trial 40983): a randomised controlled trial. *Lancet.* 2008; 22;371(9617):1007-16.
26. Garufi C , Torsello A, Tumolo S ,Ettorre GM,, Zeuli M , Campanella C ,Vennarecci G , Mottolese M , Sperduti I and Cognetti F. Cetuximab plus chronomodulated irinotecan, 5-fluorouracil, leucovorin and oxaliplatin as neoadjuvant chemotherapy in colorectal liver metastases: POCHER trial. *Br J Cancer* 2010; 103, 1542 – 1547
27. Van Cutsem E, Köhne C-H, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien Ch-R, Makhson A, D'Haens G, Pintér T, Lim R, Bodoky Ch.B.G, Kyung Roh JK, Folprecht G, Ruff P, Stroh Ch, Tejpar S, Schlichting M, Nippgen J, Rougier Ph. Cetuximab and Chemotherapy as Initial Treatment for Metastatic Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 2009; 360:1408-1417
28. Folprecht G. Gruenberger T, Bechstein WO, Raab HR, Lordick F, Hartmann JT, et al. Tumour response and secondary resectability of colorectal liver metastases following neoadjuvant chemotherapy with cetuximab: the CELIM randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2010;11(1):38-47
29. Vauthey JN, Pawlik TM, Ribero D, Wu TT, Zorzi D, Hoff PM, et al. Chemotherapy regimen predicts steatohepatitis and an increase in 90-day mortality after surgery for hepatic colorectal metastases. *J Clin Oncol.* 2006;1;24(13):2065-72.

30. Ribero D, Wang H, Donadon M, Zorzi D, Thomas MB, Eng C, et al. Bevacizumab improves pathologic response and protects against hepatic injury in patients treated with oxaliplatin-based chemotherapy for colorectal liver metastases. *Cancer*. 2007;110(12), 2761-2767
31. Bismuth H, Adam R, Levi F, Farabos C, Waechter F, Castaing D, et al. Resection of nonresectable liver metastases from colorectal cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Ann Surg* 1996;224:509–520.
32. Folprecht G, Grothey A, Alberts S, Raab HR, Kohne CH. Neoadjuvant treatment of unresectable colorectal liver metastases: correlation between tumour response and resection rates. *Ann Oncol* 2005;16:1311–1319.
33. Ychou M, Rivoire M, Thezenas S, Quenet F, Delpero JR, Rebischung C, et al. A randomized phase II trial of three intensified chemotherapy regimens in first-line treatment of colorectal cancer patients with initially unresectable or not optimally resectable liver metastases. The METHEP trial. *Ann Surg Oncol* 2013;20:4289–4297.
34. Loupakakis F, Cremolini C, Masi G, Lonardi S, Zagonel V, Salvatore L, et al. Initial therapy with FOLFOXIRI and bevacizumab for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2014;371:1609–1618
35. Heinemann V, von Weikersthal LF, Decker T, Kiani A, Vehling-Kaiser U, Al-Batran S-E, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014;15:1065–1075.
36. Kemeny N, Huang Y, Cohen AM, Shi W, Conti JA, Brennan MF, et al. Hepatic arterial infusion of chemotherapy after resection of hepatic metastases from colorectal cancer. *N Engl J Med* 1999;341:2039–2048.
37. Nelson RL, Freels S. Hepatic artery adjuvant chemotherapy for patients having resection or ablation of colorectal cancer metastatic to the liver. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2006, Issue 4. Art. No.: CD003770
38. Benoist S, Brouquet A, Penna C, Julié C, El Hajjam M, Chagnon S. et al. Complete response of colorectal liver metastases after chemotherapy: does it mean cure? *J Clin Oncol* 2006;24:3939–3945
39. Choi H, Charnsangavej C, Faria SC, Macapinlac HA, Burgess MA, Patel SR, et al. Correlation of computed tomography and positron emission tomography in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor treated at a single

- institution with imatinib mesylate: proposal of new computed tomography response criteria. *J Clin Oncol* 2007; 25:1753–1759
40. Chun YS, Vauthey JN, Boonsirikamchai P, Maru DM, Kopetz S, Palavecino M P, et al. Association of computed tomography morphologic criteria with pathologic response and survival in patients treated with bevacizumab for colorectal liver metastases. *JAMA* 2009; 302:2338–2344
  41. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New Response Evaluation Criteria in Solid Tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009; 45:228–247
  42. van Persijn van Meerten EL, Gelderblom H, Bloem JL. RECIST revised: implications for the radiologist—a review article on the modified RECIST guideline. *Eur Radiol* 2010; 20:1456–1467
  43. Grothey A, Hedrick EE, Mass RD, Sarkar S, Suzuki S, Ramanathan RK, et al. Response-independent survival benefit in metastatic colorectal cancer: a comparative analysis of N9741 and AVF2107. *J Clin Oncol* 2008; 26:183–189
  44. Blazer DG 3rd, Kishi Y, Maru DM, Kopetz S, Chun YS, Overman MJ, et al. Pathologic response to preoperative chemotherapy: a new outcome end point after resection of hepatic colorectal metastases, *J Clin Oncol*. 2008;26(33):5344-51
  45. Rubbia-Brandt L, Giostra E, Brezault C, Roth AD, Andres A, Audard V, Importance of histological tumor response assessment in predicting the outcome in patients with colorectal liver metastases treated with neoadjuvant chemotherapy followed by liver surgery, *Ann Oncol* (2007) 18 (2): 299-304
  46. Wan NN, Li ZH, Zhao H, Tao YF, Xu X, Lu J, et al. Molecular Targeting of the Oncoprotein PLK1 in Pediatric Acute Myeloid Leukemia: RO3280, a Novel PLK1 Inhibitor, Induces Apoptosis in Leukemia Cells *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 1266-92
  47. Ackermann S, Goeser F, Schulte JH, Schramm A, Ehemann V, Hero B, et al. Polo-like kinase 1 is a therapeutic target in high-risk neuroblastoma. *Clin. Cancer Res.* 2011, 17, 731–41
  48. Pellegrino R, Calvisi DF, Ladu S, Ehemann V, Staniscia T, Evert M, et al. Oncogenic and tumor suppressive roles of Polo-like kinases in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2010, 51, 857–68

49. Zhang Y, Liu Y, Yang YX, Xia JH, Zhang HX, Li HB, Yu CZ.. The expression of PLK-1 in cervical carcinoma: a possible target for enhancing chemosensitivity. *J Exp Clin Cancer Res.* 2009.;28:130–138
50. Zhang Z, Zhang G, Kong C. High expression of Polo-like kinase 1 is associated with the metastasis and recurrence in urothelial carcinoma of bladder. *Urol. Oncol.* 2013, 31, 1222–30
51. Zhang G, Zhang Z, Liu Z. Polo-like kinase 1 is overexpressed in renal cancer and participates in the proliferation and invasion of renal cancer cells. *Tumour Biol.* 2013, 34, 1887–94
52. Maire V, Nemati F, Richardson M, Vincent-Salomon A, Tesson B, Rigai G, et al. Polo-like kinase 1: A potential therapeutic option in combination with conventional chemotherapy for the management of patients with triple-negative breast cancer. *Cancer Res.* 2013, 73, 813–23
53. Maru DM, Kopetz S, Boonsirikamchai P, Agarwal A, Chun YS, Wang H, et al., Tumor thickness at the tumor-normal interface: a novel pathologic indicator of chemotherapy response in hepatic colorectal metastases. *Am J Surg Pathol.* 2010 ;34(9):1287-94.
54. Cortés Guiral D, Fernández-Aceñero MJ, García-Olmo D, Pastor Idoate C. Factors Predicting Response to Neoadjuvant Therapy of Hepatic Metastasis from Colorectal Carcinoma. *Int J Pathol Clin Res* 2015;1:009
55. Fernández-Aceñero M J, Cortés-Guiral D, Munoz L E, Martínez-Useros J, Pastor-Idoate C. Morphological aspects of the hepatic response to neoadjuvant therapy. *Pathology-Research and Practice*, 2015;211(9), 665-670.
56. Benada J, Burdov K, Lidak T, von Morgen P, Macurek L. Polo-like kinase 1 inhibits DNA damage response during mitosis. *CellCycle.* 2015;14(2):219-31
57. van Vugt MA, Gardino AK, Linding R, Ostheimer GJ, Reinhardt HC, Ong SE, et al. A mitotic phosphorylation feedback network connects Cdk1, Plk1, 53BP1, and Chk2 to inactivate the G2/M DNA damage checkpoint. *PLoS Biol.* 2010;26;8(1)
58. Chen S, Bartkovitz D, Cai J, Chen Y, Chen Z, Chu XJ, et al. Identification of novel, potent and selective inhibitors of polo-like kinase 1 *Bioorg Med Chem Lett.* 2012 ;22(2):1247-50
59. Berg T, Bug G, Ottmann OG, Strebhardt K. Polo-like kinases in AML *Expert Opin Investig Drugs.* 2012;21(8):1069-74

60. Stadler WM, Vaughn DJ, Sonpavde G, Vogelzang NJ, Tagawa ST, Petrylak DP, et al. (2014) An open-label, single-arm, phase 2 trial of the polo-like kinase inhibitor volasertib (BI6727) in patients with locally advanced or metastatic urothelial cancer. *Cancer*. 2014;120(7):976-82
61. Lin CC, Su WC, Yen CJ<sup>2</sup>, Hsu CH<sup>3</sup>, Su WP<sup>2</sup>, Yeh KH<sup>3</sup>, et al. A phase I study of two dosing schedules of volasertib (BI6727), an intravenous polo-like kinase inhibitor, in patients with advanced solid malignancies. *Br J Cancer*. 2014;110(10):2434-4
62. Bowles DW, Diamond JR, Lam ET, Weekes CD, Astling DP, Anderson RT, et al. Phase I study of oral rigosertib (ON 01910. Na), a dual inhibitor of the PI3K and PLK1 pathways, in adult patients with advanced solid malignancies. *Clin Cancer Res*. 2014;20(6):1656-65
63. Wang NN, Li ZH, Zhao H, Tao YF, Xu LX, Lu J, et al. Molecular targeting of the oncoprotein PLK1 in pediatric acute myeloid leukaemia: RO3280, a novel PLK1 inhibitor, induces apoptosis in leukaemia cells. *Int J Mol Sci*. 2015;16(1):1266-92
64. Fernández-Aceñero M J, Cortés D, Del Pulgar TG, Cebrián A, Estrada L, Martínez-Useros J. et al. PLK-1 Expression is Associated with Histopathological Response to Neoadjuvant Therapy of Hepatic Metastasis of Colorectal Carcinoma. *Pathol. Oncol. Res*. 2016;22: 377-383.
65. Cebrián A, del Pulgar TG, Fernández-Aceñero M J, Borrero-Palacios A, del Puerto-Nevado L, Martínez-Useros J, et al. . Decreased PLK1 expression denotes therapy resistance and unfavourable disease-free survival in rectal cancer patients receiving neoadjuvant chemoradiotherapy. *Pathology-Research and Practice*, 2016;212(12), 1133-1137.
66. Shindoh J, , Loyer EM, Kopetz S, Boonsirikamchai P, Maru DM, Chun YS, et al. Optimal morphologic response to preoperative chemotherapy: an alternate outcome end point before resection of hepatic colorectal metastases. *J Clin Oncol*. 2012; 20;30(36):4566-72
67. Choti MA, Sitzmann JV, Tiburi MF, Sumetchotimetha W, Rangsri R, et al. Trends in Long-Term Survival Following Liver Resection for Hepatic Colorectal Metastases. *Ann Surg*. 2002 Jun;235(6):759-66
68. Wanebo HJ, LeGolvan M, Paty PB, Saha S, Zuber M, D'Angelica MI, ., et al. Meeting the biologic challenge of colorectal metastases. *Clin Exp Metastasis* 2012;29:821–839

69. Rothe JH, Grieser C, Lehmkuhl L, Schnapauff D, Fernandez CP, Maurer MH, , et al. Size determination and response assessment of liver metastases with computed tomography—comparison of RECIST and volumetric algorithms. *Eur J Radiol* 2013;82:1831–1839
70. ChunYS, , et al. (2009) Association of computed tomography morphologic criteria with pathologic response and survival in patients treated with bevacizumab for colorectal liver metastases. *J Am Med Assoc* . 2009 ;302(21):2338-44
71. T. Wakai, Y. Shirai, J. Sakata, H. Kameyama, H. Nogami, T. Iiai, et al., Histologic evaluation of intrahepatic micrometastases in patients treated with or without neoadjuvant chemotherapy for colorectal carcinoma liver metastasis, *Int J Clin Exp Pathol*. 2012; 5(4): 308–314
72. N. Klijn, J.A.M. de Ridder, C.J.A. Punt, J.H.W. de Wilt, I.D. Nagtegaal. Histopathological evaluation of resected colorectal cancer liver metastases: what should be done? *Histopathology*. 2013;63:149–156.
73. Okano K, Yamamoto J, Kosuge T, Yamamoto S, Sakamoto M, Nakanishi Y, et al., Fibrous pseudocapsule of metastatic liver tumors from colorectal carcinoma. Clinicopathologic study of 152 first resection cases, *Cancer*. 2000; 89: 267–275.
74. Gómez-Dorransoro M, Miguel R, Ortega L, Hörndler C, Antúnez JR, Villar-Pastor CM, et al., Recomendaciones para el estudio patológico de las metástasis hepáticas de cáncer colorrectal tras neoadyuvancia, *Consenso Nac. Soc. Española Anat. Patol. Rev. Esp. Patol*. 2014;47:90–99.
75. J. Yamamoto, K. Shimada, T. Kosuge, S. Yamasaki, M. Sakamoto, H. Fukuda, Factors influencing survival of patients undergoing hepatectomy for colorectal metastases, *Br. J. Surg*. 1999;86(3)332–337.
76. H.H. Li-Chang, D.K. Driman, Evaluating necrosis and chemotherapy response in colorectal cancer liver metastases, *Histopathology*. 2013; 63: 294–295.
77. C.J. Xu, T. Mikami, T. Nakamura, T. Tsuruta, N. Nakada, N. Yanagisawa, et al., Tumor budding, myofibroblast proliferation, and fibrosis in obstructing colon carcinoma: the roles of Hsp47 and basic fibroblast growth factor, *Pathol. Res. Pract*. 2013;209 (2): 69–74.
78. Fernández-Aceñero MJ, Galindo-Gallego M, Sanz J, Aljama A., Prognostic influence of tumor-associated eosinophilic infiltrate in colorectal carcinoma, *Cancer*. 2000;88(7):1544-8

79. Abengózar M, Fernández-Aceñero MJ, Chaves S, Celdrán A. Prognostic utility of tumor thickness at the tumor-normal interface in chemotherapy-treated hepatic colorectal metastasis. *Pathol Res Pract*. 2012;208(4):235-9

# Anexo I



# Publicaciones generadas por la Tesis

- **Publicación:** PLK-1 Expression is Associated with Histopathological Response to Neoadjuvant Therapy of Hepatic Metastasis of Colorectal Carcinoma. Fernández-Aceñero MJ, Cortés D, Gómez Del Pulgar T, Cebrián A, Estrada L, Martínez-Useros J, Celdrán A, García-Foncillas J, Pastor C. Pathol Oncol Res. 2015 Nov 17
- **Publicación:** Cortés Guiral D, Fernández-Aceñero MJ, García-Olmo D, Pastor Idoate C. Factors Predicting Response to Neoadjuvant Therapy of Hepatic Metastasis from Colorectal Carcinoma. Int J Pathol Clin Res 2015;1:009
- **Publicación:** Fernández-Aceñero M J, Cortés-Guiral D, Muñoz L E, Martínez-Useros J, Pastor-Idoate C. Morphological aspects of the hepatic response to neoadjuvant therapy. Pathology-Research and Practice, 2015;211(9), 665-670.
- **Publicación:** D.Cortés-Guiral, C.Pastor-Idoate, C.Díaz del Arco, L.del Puerto-Nevado, M.J.Fernández-Aceñero, CPEB4 immunohistochemical expression is ~ associated to prognosis in stage IV colorectal carcinoma, Pathology - Research and Practice <http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2017.04.020>

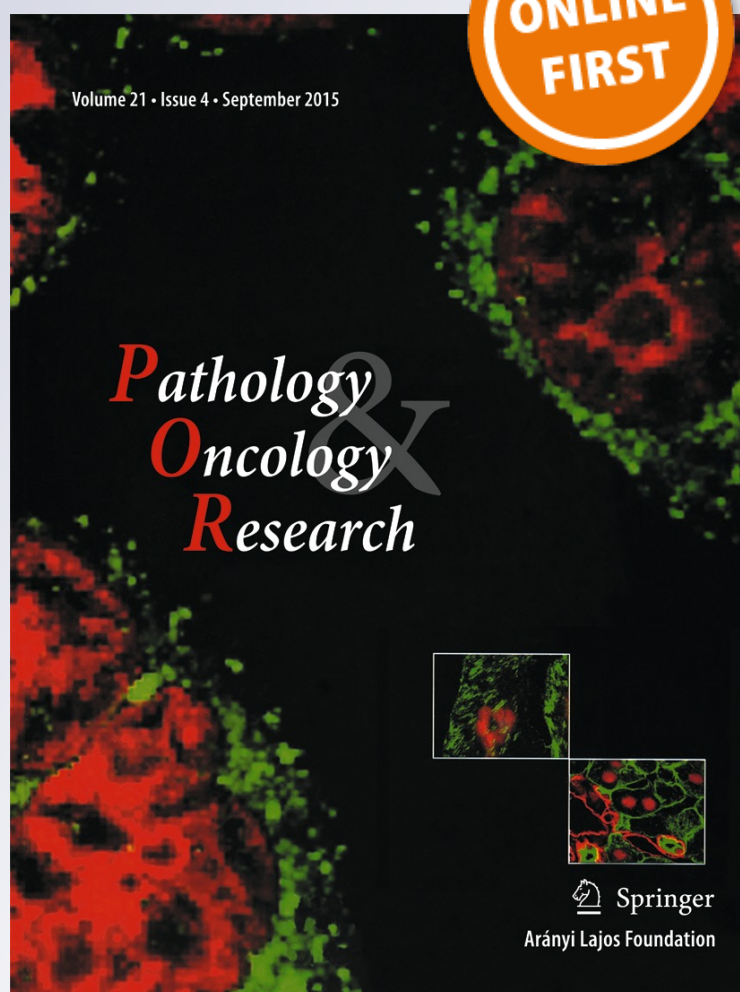
# *PLK-1 Expression is Associated with Histopathological Response to Neoadjuvant Therapy of Hepatic Metastasis of Colorectal Carcinoma*

**M. J. Fernández-Aceñero, D. Cortés, T. Gómez del Pulgar, A. Cebrián, L. Estrada, J. Martínez-Useros, A. Celdrán, J. García-Foncillas, et al.**

**Pathology & Oncology Research**  
Official Journal of the Arányi Lajos Foundation

ISSN 1219-4956

Pathol. Oncol. Res.  
DOI 10.1007/s12253-015-0015-8



**Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Arányi Lajos Foundation. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at [link.springer.com](http://link.springer.com)".**

ORIGINAL ARTICLE

# PLK-1 Expression is Associated with Histopathological Response to Neoadjuvant Therapy of Hepatic Metastasis of Colorectal Carcinoma

M. J. Fernández-Aceñero<sup>1</sup> · D. Cortés<sup>2</sup> · T. Gómez del Pulgar<sup>3</sup> · A. Cebrián<sup>3</sup> · L. Estrada<sup>1</sup> · J. Martínez-Useros<sup>3</sup> · A. Celdrán<sup>2</sup> · J. García-Foncillas<sup>3</sup> · C. Pastor<sup>2</sup>

Received: 14 August 2015 / Accepted: 12 November 2015  
© Arányi Lajos Foundation 2015

**Abstract** Polo-like kinase 1 (PLK1) is a serine/threonine-protein kinase expressed during mitosis and overexpressed in multiple human cancers, including leukemia and also many solid tumors. PLK1 knockdown has been shown to block proliferation of leukemic cell lines and the clonogenic potential of tumor cells grown from patients with cancer. PLK1 inhibition is a promising strategy for the treatment of some tumors. We aim to analyze expression of PLK1 in metastatic colorectal carcinoma. Retrospective analysis of colorectal carcinomas with hepatic metastasis during follow-up receiving neoadjuvant chemotherapy (NAC), based on oxaliplatin. Immunohistochemistry for PLK-1 in paraffin-embedded tissue from the primary and also from the metastasis. 50 patients. 32 % showed good histopathological response. 43 % of the primaries were positive for PLK1, as opposed to 23.5 % of the metastasis. Expression of PLK1 was significantly reduced in metastasis compared with the primaries ( $p = 0.05$ ), what could be due to therapy or to a phenotypic change of the metastatic nodule. Analysis of the prognostic influence of PLK1 expression showed significant association between PLK1 expression in metastasis and lower overall survival ( $p = 0.000$ ). We have also found a significant association between PLK1 expression and histopathological response ( $p = 0.02$ ). All the tumors with

high expression of PLK1 showed minor response (11/11). This study shows the association between survival and poor histopathological response to therapy and high expression of PLK1 in metastasis. Our results could open a new therapeutic approach through the inhibition of PLK1.

**Keywords** Hepatic metastasis · Colorectal carcinoma · Neoadjuvant therapy · PLK1 · Histopathological response · Targeted drugs

## Introduction

Colorectal carcinoma is one of the most frequent human malignancies, mainly in developed countries [1]. Despite recent advances in therapy, mainly after the introduction of targeted drugs against EGFR and VEGFR [2], mortality remains high for advanced stages, especially for metastatic disease. The best therapeutic option for metastasis amenable to resection is surgery [3], but neoadjuvant chemotherapy (NAC) is being increasingly used as a therapeutic alternative for patients with metastatic disease before resection [4]. Several strategies have been developed to grade histopathological response of the metastatic tumor to NAC [5] and this factor is very important to predict the outcome of the patients [6]. Besides, there is a growing interest in predicting response to therapy to avoid delays in efficient management in cases of NAC failure. It is also essential to find factors that can guide the need of adjuvant therapy after metastasis resection surgery. Targeted drugs could have a crucial importance in this setting.

As it is known, cells protect their genome integrity by a conserved DNA damage response pathway (DDR) that coordinates DNA repair with control of the cell cycle progression. Many molecules are involved in these repair mechanisms. PLK1 is a serine/threonine-protein kinase expressed during

✉ M. J. Fernández-Aceñero  
mgg10167@gmail.com

<sup>1</sup> Department of Surgical Pathology, Hospital Clínico San Carlos, C/ Profesor Martín Lagos s/n, 28040 Madrid, Spain

<sup>2</sup> Department of Surgery, Health Research Institute FJD-UAM, University Hospital Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

<sup>3</sup> Translational Oncology Division, Oncohealth Institute, Health Research Institute FJD-UAM, University Hospital Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

mitosis; PLK1 plays an essential role in the control of mitotic spindle formation and cytokinesis. In addition, it is required for recovery from the G2 checkpoint. Some recent reports have proposed that PLK1 participates in the phosphorylation of 53BP1 and this phosphorylation leads to an altered recognition and repair of the DNA damaged sites [7]. PLK1 is overexpressed in many human cancers, including most cases of acute myelogenous leukaemia (AML). PLK1 knockdown by small interfering RNA blocks proliferation of leukemic cell lines and the clonogenic potential of primary cells from patients. PLK1 inhibition is a promising strategy for the treatment of AML. Depletion or inhibition of kinase activity of PLK1 is sufficient to induce cell-cycle arrest and apoptosis in cancer cell lines and in xenograft tumor models. Recent studies have also shown that PLK1 expression is a prognostic marker for urothelial [8], renal cell [9], and triple negative breast carcinoma [10], among other solid tumors [11–13]. The chance to selectively target this molecule could open new therapeutic approaches in these tumors. We have found few references to the prognostic and pathogenic significance of PLK1 in colorectal carcinoma [13], but no references to the possible prognostic influence of this kinase in gastrointestinal metastatic malignant tumors. The aim of the present study is to analyze PLK1 expression in metastatic colorectal carcinoma treated with NAC.

## Material and Methods

### Patient and Tissue Samples

We have retrospectively reviewed the electronic records of the patients with colorectal carcinoma treated at the Fundación Jiménez Díaz Hospital in Madrid (Spain). From these we have included in the study those with initially resectable hepatic metastasis that received NAC and were subsequently operated with disease free margins. After surgery they received standard adjuvant therapy.

We have collected general demographic and clinical data and also data from the primary tumor (location, differentiation grade, vascular invasion, inflammatory response, TNM staging).

### Evaluation of Histological Response to NAC

We have reviewed the stained slides of the metastatic hepatic nodules to describe the morphological response to therapy according to the criteria established by Blazer et al. [5] which was employed as one of the outcome variables in the present study. In short we considered cases with complete response as the total absence of tumor in the resection specimen; major response as the persistence of less than 50 % of tumor cells in the specimen; and minor response as the persistence of more

than 50 % of tumor cells. Prognosis of the patients was measured by time to recurrence (disease free survival; DFS) and by the time to death due to the tumor (overall survival; OS), both expressed in months.

### Immunohistochemistry

We selected formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue samples from 50 primary tumors and from 50 hepatic metastasis and used them for Tissue Microarray (TMA) construction. Representative tumor regions from biopsies were identified by a pathologist on hematoxylin and eosin-stained tissue sections. After pathologist review, TMAs were assembled from triplicate 0.6 mm cores of FFPE biopsy tumor samples using a TMA workstation MTA-1 (Beecher Instruments). All the immunohistochemical techniques were performed in the Surgical Pathology Department at Fundación Jiménez Díaz. Antigen retrieval was performed in PT-Link (Dako) for 20 min at 95 °C in high pH buffered solution (Dako). Endogenous peroxidase was blocked, by immersing the sections in 0.03 % hydrogen peroxide for 5 min. Slides were washed for 5 min with Tris buffered saline solution containing Tween 20 at pH 7.6 and incubated with the primary antibodies anti-PLK1 (Abcam) for 20 min at room temperature, followed by incubation with the appropriate anti-Ig horseradish peroxidase-conjugated polymer (EnVision, Dako) to detect antigen-antibody. Sections were then visualized with 3, 3'-diaminobenzidine as a chromogen for 5 min and counterstained with hematoxylin. All immunohistochemical stainings were performed in a Dako Autostainer. FFPE tissue samples from healthy testis were stained as positive controls for PLK1.

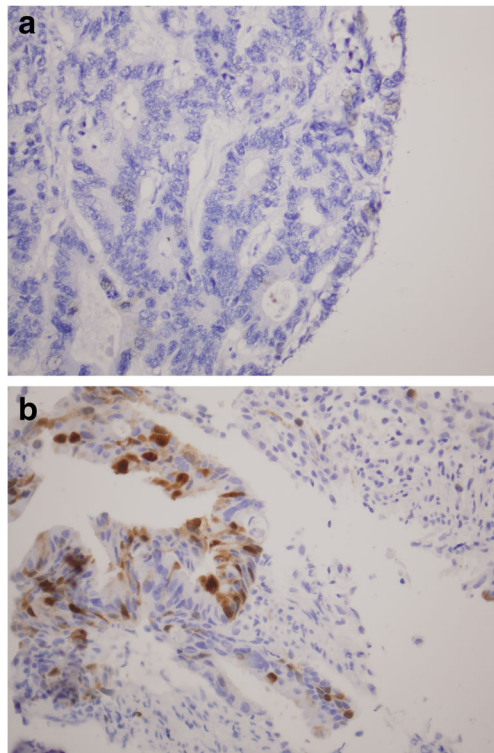
### Evaluation of Immunohistochemistry

PLK1 expression was scored positive when >10 % of tumor cells showed immunoreactivity (Fig. 1). The cut-off point for PLK was established with an operator-receiver characteristics (COR) curve. As all our cases showed an intense immunohistochemical reaction, we employed the percentage of positive cells to classify cases instead of the H-score previously employed by other authors [7].

### Statistical Analysis

Data was analyzed with SPSS for Windows 20.0 statistical package (IBM corporation). Association between PLK1 expression and clinicopathological and outcome variables were evaluated by chi-squared (or Fisher's exact test) or Student's T test for mean comparison, as indicated. For survival analysis we compared the Kaplan-Meier curves with the log-rank test. The level of statistical significance was defined as a *P* value less than 0.05.





**Fig. 1** **a** and **b** PLK1 immunohistochemical expression. On the right there is a negative case (**a**) and on the left a positive case (**b**) (immunohistochemistry for PLK1,  $\times 200$ )

Permission for this study was obtained by the Ethical Committee on Scientific Investigation of our hospital (given in written form in April 2014). This study is in accordance to national regulations regarding personal data protection and also to the Declaration of Helsinki.

## Results

Fifty patients fulfilled inclusion criteria for the present study. Table 1 summarizes the general characteristics of the series. Table 2 summarizes the histopathological features of the colon primaries, according to the histopathological response of the hepatic nodule to NAC, following Blazer's criteria (data of the analysis of the prognostic influence of these histopathological features are not shown). All our patients received a NAC regimen based on oxaliplatin and fluoropyrimidines following the local guidelines for this disease and targeted drugs were only added in 18 % of the patients (mainly anti-VEGF drugs).

Immunohistochemistry for PLK1 of the primary tumor revealed that 43 % of the tumors were positive, as opposed to 23.5 % of the metastasis ( $p = 0.05$ ). PLK1 was significantly more frequently expressed in colonic tumors (64 %) than in rectal-sigmoid ones (32 %) ( $p = 0.02$ ) and PLK1 expression in metastasis was found in 35 % of colonic primaries as opposed

**Table 1** General characteristics of the 50 patients fulfilling inclusion criteria

	Percentage
Gender	Male: 54 % Female: 46 %
Age	62.3 (11.3)
Comorbidities	No: 70 % Yes: 30 %
Family history of cancer	No: 74 % Yes: 26 %
Personal history of cancer	No: 82 % Yes: 18 %
Location of primary tumor	Rectosigmoid: 66 % Other: 44 %
T stage of primary	T1: 2 % T2: 10 % T3: 80 % T4: 8 %
N stage of primary	N0: 50 % N1: 30 % N2: 20 %
Histopathological response to therapy	Complete: 6 % Major: 20 % Minor: 68 %
Recurrence	No: 12 % Yes: 88 %
DFS	20.9 (14.3)
Death	No: 36 % Yes: 62 % Lost: 2 %
OS	52.5 (36.5)

Data are expressed either as percentages or mean (SD), as indicated

to 16 % of rectal tumors (although with a  $p$  value 0.16, this difference did not reach statistical significance). We found no significant association between PLK1 expression and any of the demographic characteristics of the patients. We only found a statistically significant association between the kind of growth at the leading edge of the primary and PLK1 expression. Of the tumors with a pushing leading edge, 72 % showed expression of PLK1 as opposed to 33 % of tumors, which showed an infiltrative edge ( $p = 0.03$  for the Fisher's exact test).

We analyzed the possible association between outcome and PLK1 expression both in the primary tumor and the metastasis. We found that PLK1 expression in the tissue from the primary tumor was not significantly associated to DFS or OS, but we found a statistically significant difference in OS between metastasis expressing PLK1 and those that lost expression ( $p = 0.000$ ; 95 % CI: 16.1–48.9 mo) (Table 3). This prognostic significance was also shown through the

**Table 2** Histopathological features of the primary tumors

	Complete response ( <i>n</i> = 3) <sup>a</sup>	Major response ( <i>n</i> = 10)	Minor response ( <i>n</i> = 34) <sup>a</sup>
Differentiation	Low grade 1 (50 %) High grade 1 (50 %)	Low grade 3 (30 %) High grade 7 (70 %)	Low grade 27 (84.5 %) High grade 5 (15.5 %)
Location	Colon 0 Sigmoid-rectum 3 (100 %)	Colon 3 (30 %) Sigmoid-rectum 7 (70 %)	Colon 13 (38 %) Sigmoid-rectum 21 (62 %)
Vessel invasion	Present 0 Absent 2 (100 %)	Present 1 (10 %) Absent 9 (90 %)	Present 8 (25 %) Absent 24 (75 %)
Lymphohistiocytic Inflammatory reaction	Absent 1 (50 %) Scarce 1 (50 %) Intense 0	Absent 5 (50 %) Scarce 3 (30 %) Intense 2 (20 %)	Absent 17 (53 %) Scarce 6 (19 %) Intense 9 (28 %)
Leading front	Pushing 0 Infiltrative 2 (100 %)	Pushing 3 (30 %) Infiltrative 7 (70 %)	Pushing 9 (28 %) Infiltrative 23 (72 %)
Desmoplasia	Absent 2 (100 %) Present 0	Absent 7 (70 %) Present 3 (30 %)	Absent 28 (87.5 %) Present 4 (12.5 %)
Mucin production	Absent 2 (100 %) Present 0	Absent 10 (10 %) Present 0	Absent 27 (84.4 %) Present 5 (15.6 %)
pT stage	T1 0 T2 1 (33 %) T3 2 (64 %) T4 0	T1 1 (10 %) T2 1 (10 %) T3 7 (70 %) T4 1 (10 %)	T1 0 T2 2 (6 %) T3 29 (85 %) T4 3 (9 %)
pN stage	N0 3 (100 %) N1 0 N2 0	N0 4 (40 %) N1 2 (20 %) N2 4 (40 %)	N0 15 (44 %) N1 13 (38 %) N2 6 (8 %)

<sup>a</sup> Histopathological data of the primaries were missing in one patient from the complete response group and two from the minor response group

comparison of the survival curves between groups with the log-rank test (Fig. 2). In our study we did not confirm the prognostic significance of histopathological response in terms of OS and DFS, as shown by other studies (Table 4).

As for histopathological response, we found a significant association between PLK1 positivity in the metastatic nodule and a minor histopathological response. In our series none of the 11 patients with high PLK1 expression in the metastasis showed major response to therapy (Table 5).

## Discussion

It is well known that almost 50 % of the patients with colon carcinoma will develop metastasis during follow-up and to

improve survival it is essential to design aggressive therapeutic schemes that try to reduce the burden of disease and enhance response to adjuvant chemotherapy and also to targeted drugs [2]. Surgery of metastasis is the best therapeutic alternative [3], but sometimes it is difficult to achieve complete resection or surgery is technically complex, and some groups advocate the use of NAC [14]. NAC is usually based on oxaliplatin or irinotecan associated to fluoropyrimidines. Some schemes also employ targeted drugs (namely, anti-EGF and anti-VEGF drugs) in this setting. The response to therapy is usually followed with serial CT scans during NAC, for progression of disease could even make surgical resection impossible or recommend NAC cessation. However, it is rather clear than the RECIST criteria, which rely on size reduction, are not well correlated to the histopathological response [15] and also that they do not precisely predict prognosis after resection. Acknowledging this, radiologists have developed the so called morphological criteria [16, 17], which seem to correlate better with histopathological response.

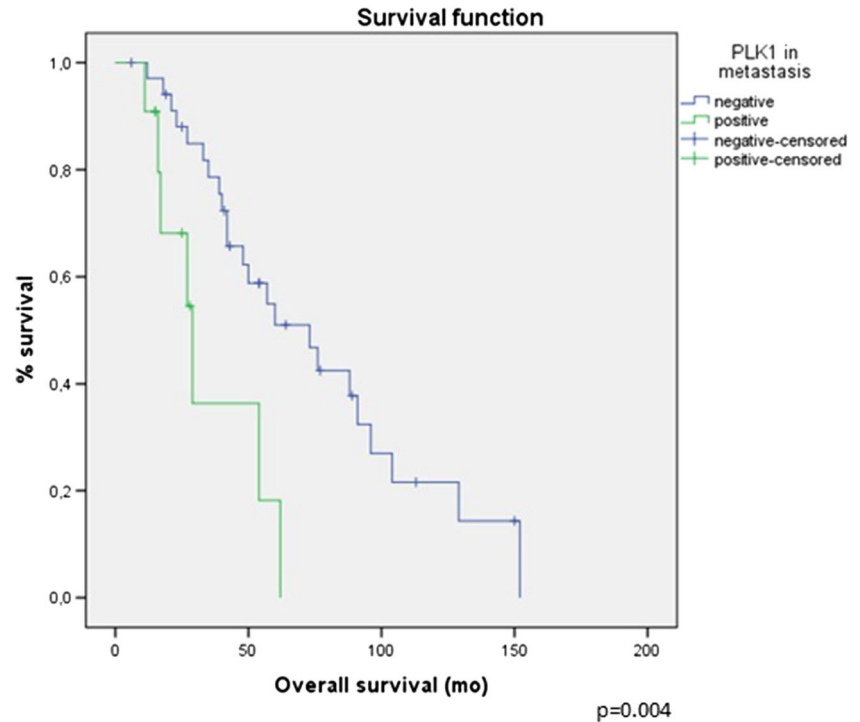
On the other hand, selective targeting of small molecules of the tyrosine kinase family is becoming an ever-more used strategy to manage cancer [13]. PLK1 is a serine-threonine kinase that plays an essential role in control of mitotic spindle formation and cytokinesis [7]. In addition, PLK1 is required for recovery from the G<sub>2</sub> checkpoint. PLK1 has been reported

**Table 3** Association between outcome measures and PLK1 expression both in the primary tumor and metastasis

	DFS	<i>p</i> value	OS	<i>p</i> value
PLK1 expression primary tumor	Negative: 19.9 Positive: 18.5	0.77	Negative: 51.7 Positive: 45	0.26
PLK1 expression metastasis	Negative: 21.7 Positive: 16.8	0.55	Negative: 59.7 Positive: 27.1	0.00

Mean comparison for DFS and OS values in months

**Fig. 2** Kaplan-Meier curves for overall survival in the PLK1 positive and negative metastatic nodules



to phosphorylate Chk2 in the FHA domain and to prevent its activation in mitosis [18]. Several reports show that expression of PLK1 is significantly lower in non-transformed cells and this makes this molecule an especially interesting target which might be antagonized selectively in neoplastic cells. Depletion or inhibition of kinase activity of PLK1 is sufficient to induce cell-cycle arrest and apoptosis in cancer cell lines and in xenograft tumor models [19]. There are some reports with anti-PLK1 drugs both for leukaemia [20] and for solid tumors [21] and there have been phase I clinical trials using intravenous [22] or oral [23] PLK1 inhibitors, with promising results. In conclusion, PLK1 seems to be a promising target for future development of targeted drugs against both leukaemia and many kinds of solid tumors.

However, in our literature review we have found no reference to the possible prognostic influence of PLK1 expression in metastatic colorectal cancer. Therapy of metastasis has greatly evolved in recent years and aggressive management with chemotherapy and surgical resection is now the standard of care for these patients, with an important improvement in prognosis. Nevertheless, these patients tend to recur and many eventually die of disease. In our study we first compared the

immunohistochemical expression of PLK1 between the primary tumor and the metastasis, showing a significant reduction of expression in the metastatic nodules. Also, our study had 50 patients treated with conventional NAC associated or not to targeted drugs against EGF and VEGF, and successfully showed a significant association between PLK1 expression in the metastasis and overall survival. If in the near future experimental studies on human tumor cell lines and clinical trials confirmed the efficacy of some of the selective antagonists for PLK1 to control growth and induce apoptosis in colorectal carcinoma (as has been shown in leukaemia both clinically and experimentally) [24], these drugs could become an option for the adjuvant therapy in selected cases of metastatic colorectal carcinoma. In the present study PLK1 expression has been shown to predict a minor response to NAC and a worse prognosis of disease and the chance to control the activity of this molecule could become a useful therapeutic tool in patients with metastatic colonic carcinoma after conventional therapy. Interestingly, this effect has been shown to be

**Table 4** Prognostic value of the histopathological response to NAC for DFS and OS

	DFS	p value	OS	p value
Response to NAC	Minor: 20.22 Major: 23	0.55	Negative: 47.2 Positive: 54.4	0.58

**Table 5** Association between PLK1 expression in metastasis and response to therapy

		Negative	Positive	Total
Response	Minor response	23	11	34
	Major response	13	0	13
Total		36	11	47

p value for the xi squared test: 0.02



independent of the use of anti-EGF or anti-VEGF drugs in a stratified subgroup analysis.

The present study has several drawbacks, which deserve to be mentioned. The most important drawback is the small number of cases. Despite the series being small, the patients are rather homogeneous and we consider them representative of standard disease management in developed countries. Despite the small number of cases, which could compromise the power of the study, we have found significant differences, which should be confirmed by larger studies. Also, the retrospective nature of the study is another limitation to the design. It is also necessary to design better powered studies that take into account other well-known factors that can influence both prognosis and response to therapy in these patients, including lymph node involvement at diagnosis, CEA levels, among others, that could not be analysed in the present study due to the small sample size. The forementioned size limitation also makes it difficult to draw sound conclusions regarding the possible influence of tumor location (rectal as opposed to colonic) or therapeutic differences due to targeted drugs. Prospective better powered studies should be undertaken to confirm the preliminary results found by our group.

## Conclusion

We herein report the first series of cases in which PLK1 expression has been shown to predict lack of response to neoadjuvant therapy of metastatic colorectal disease and also bad prognosis in terms of overall survival. The existence of small drugs selectively antagonizing PLK1 could open a new way for the management of this complex group of patients in the near future, if our results are confirmed in larger prospective studies or clinical trials.

**Acknowledgments** The authors want to thank the collaborators at the Laboratory of Translational Oncology, Fundación Jiménez Díaz in Madrid, and specifically Laura del Puerto Nevado, PhD; María Rodríguez-Remírez; and Aurea Borrero-Palacios for their invaluable technical help.

**Specific Contributions to the Study** MJFA and LE: Study design, pathologic review, IHC, writing

DCG, CPI and AC: Patient selection, files review

AC, TGP, JMU and JGF: Files review, statistical analysis

## Compliance with Ethical Standards

**Conflict of Interest** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A (2011) Cancer statistics 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin* 61:212–236
2. Ribero D, Wang H, Donadon M, et al. (2007) Bevacizumab improves pathologic response and protects against hepatic injury in patients treated with oxaliplatin-based chemotherapy for colorectal liver metastases. *Cancer* 110:2761–2767
3. Pawlik TM, Scoggins CR, Zorzi D, et al. (2005) Effect of surgical margin status on survival and site of recurrence after hepatic resection for colorectal metastases. *Ann Surg* 241:715–722
4. Benoist S, Brouquet A, Penna C, et al. (2006) Complete response of colorectal liver metastases after chemotherapy: does it mean cure? *J Clin Oncol* 24:3939–3945
5. Rubbia-Brandt L, Giostra E, Brezault C, et al. (2007) Importance of histological tumor response assessment in predicting the outcome in patients with colorectal liver metastases treated with neoadjuvant chemotherapy followed by liver surgery. *Ann Oncol* 18:299–304
6. Blazer DG, Kishi J, Maru DM, et al. (2008) Pathologic response to preoperative chemotherapy: a new outcome end point after resection of hepatic colorectal metastases. *J Clin Oncol* 26:5344–5351
7. Benada J, Burdov K, Lidak T, von Morgen P, Macurek L (2015) Polo-like kinase 1 inhibits DNA damage response during mitosis. *Cell Cycle* 14:219–231
8. Zhang Z, Zhang G, Kong C (2013) High expression of polo-like kinase 1 is associated with the metastasis and recurrence in urothelial carcinoma of bladder. *Urol Oncol* 31:1222–1230
9. Zhang G, Zhang Z, Liu Z (2013) Polo-like kinase 1 is overexpressed in renal cancer and participates in the proliferation and invasion of renal cancer cells. *Tumour Biol* 34:1887–1894
10. Maire V, Nemati F, Richardson M, et al. (2013) Polo-like kinase 1: a potential therapeutic option in combination with conventional chemotherapy for the management of patients with triple-negative breast cancer. *Cancer Res* 73:813–823
11. Ackermann S, Goeser F, Schulte JH, et al. (2011) Polo-like kinase 1 is a therapeutic target in high-risk neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 17:731–741
12. Pellegrino R, Calvisi DF, Ladu S, et al. (2010) Oncogenic and tumor suppressive roles of polo-like kinases in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 51:857–868
13. Zhang Y, Liu Y, Yang YX, et al. (2009) The expression of PLK-1 in cervical carcinoma: a possible target for enhancing chemosensitivity. *J Exp Clin Cancer Res* 28:130–138
14. Wanebo HJ, LeGovan M, Paty PB, et al. (2012) Meeting the biologic challenge of colorectal metastases. *Clin Exp Metastasis* 29:821–839
15. Rothe JH, Grieser C, Lehmkuhl L, et al. (2013) Size determination and response assessment of liver metastases with computed tomography—comparison of RECIST and volumetric algorithms. *Eur J Radiol* 82:1831–1839
16. Shindoh J, Loyer EM, Kopetz S, et al. (2012) Optimal morphologic response to preoperative chemotherapy: an alternate outcome end point before resection of hepatic colorectal metastases. *J Clin Oncol* 30:4566–4572
17. Chun YS, Vauthey JN, Boonsirikamchai P, et al. (2009) Association of computed tomography morphologic criteria with pathologic response and survival in patients treated with bevacizumab for colorectal liver metastases. *J Am Med Assoc* 302:2338–2344
18. van Vugt MA, Gardino AK, Lindling R, et al. (2010) A mitotic phosphorylation feedback network connects Cdk1, Plk1, 53BP1, and Chk2 to inactivate the G2/M DNA damage checkpoint. *PLoS Biol* 8:e1000287
19. Chen S, Bartkovitz D, Cai J, et al. (2012) Identification of novel, potent and selective inhibitors of polo-like kinase 1. *Bioorg Med Chem Lett* 22:1247–1250
20. Berg T, Bug G, Ottmann OG, Strebhardt K (2012) Polo-like kinases in AML. *Expert Opin Investig Drugs* 21:1069–1074
21. Stadler WM, Vaughn DJ, Sonpavde G, et al. (2014) An open-label, single-arm, phase 2 trial of the polo-like kinase inhibitor volasertib (BI6727) in patients with locally advanced or metastatic urothelial cancer. *Cancer* 120:976–982

22. Lin CC, Su WC, Yen CJ, et al. (2014) A phase I study of two dosing schedules of volasertib (BI6727), an intravenous polo-like kinase inhibitor, in patients with advanced solid malignancies. *Br J Cancer* 110:2434–2440
23. Bowles DW, Diamond JR, Lam ET, et al. (2014) Phase I study of oral rigosertib (ON 01910. Na), a dual inhibitor of the PI3K and PLK1 pathways, in adult patients with advanced solid malignancies. *Clin Cancer Res* 20:1656–1665
24. Wan NN, Li ZH, Zhao H, et al. (2015) Molecular targeting of the oncoprotein PLK1 in pediatric acute myeloid leukaemia: RO3280, a novel PLK1 inhibitor, induces apoptosis in leukaemia cells. *Int J Mol Sci* 16:1266–1292



# Factors Predicting Response to Neoadjuvant Therapy of Hepatic Metastasis from Colorectal Carcinoma

**D. Cortés Guiral, MJ Fernández-Aceñero\*, D. García-Olmo and C. Pastor Idoate**

*Departments of Surgery, Surgical Pathology, Fundación Jiménez Díaz, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain*

**\*Corresponding author:** *Dra. MJ Fernández-Aceñero, Departament of Surgical Pathology. Hospital Clínico San Carlos C/ Profesor Martín Lagos s/n 28040 Madrid, Spain, E-mail: [mgg10167@gmail.com](mailto:mgg10167@gmail.com)*

## Summary

**Introduction:** Neoadjuvant chemotherapy (NAC) is a widely used therapeutic option for patients with resectable hepatic metastasis from colorectal carcinoma. In this setting, the intent of NAC is to reduce metastatic size and make surgery easier and/or less extensive, mostly in patients that are amenable to surgery. Several studies confirm that response to neoadjuvant therapy is indicative of a better prognosis for such patients and several methods have been proposed and validated to measure both radiological and histopathological response. However, surgery remains the only curative option for these patients and patients should be operated on after chemotherapy regardless of response. Knowing this, it would be beneficial to predict which patients are likely to respond to therapy, for a lack of response could make resection of hepatic metastatic disease more difficult or even impossible and result in a delay in efficient therapy with negative consequences for the patient. Very few studies have analyzed this issue to date. The objective of the present study is to determine the factors that can predict response to NAC of hepatic metastasis from colorectal primary tumors.

**Material and Methods:** We reviewed the files of patients with colorectal carcinoma that developed hepatic metastasis and who received neoadjuvant chemotherapy before surgical resection of metastasis. We also gathered demographic, analytical and morphological data of the cases and reviewed the hepatic resection samples to measure the pathological response to chemotherapy according to Rubbia-Brandt et al. criteria. A statistical analysis was done to define which factors can help predict response to therapy.

**Results:** 50 patients fulfilled inclusion criteria for the present study. All of them had received a chemotherapeutic regimen mainly based on platinum, associated with or without targeted drugs (18% received anti-EGFR drugs and 24% anti-VEGFR drugs). Sixty-six% of the primaries were of sigmoid-rectal origin and 32% of the cases showed a good histopathological response to therapy (including 3 cases with a complete response). As for the factors predicting response to therapy, we performed a logistic regression analysis and found that only the histological differentiation of the primaries and the CEA levels prior to NAC, were statistically significant in association with histopathological response.

**Discussion:** At this moment it is not yet possible to predict precisely whether patients are going to respond or not to neoadjuvant therapy for hepatic metastasis from colorectal primaries. Overall, there is not a well established correlation between RECIST criteria of response and histopathological response, although morphological

criteria rather than size shrinkage could potentially change this situation. Lack of response to neoadjuvant therapy could result in a delay in surgery, that could influence the prognosis of these patients and it is reasonable to predict which patients are more likely to respond to therapy. In our study, well differentiated primaries and also lower CEA levels prior to NAC predicted poor response. Nevertheless, larger studies are necessary to better resolve this question.

## Keywords

Hepatic metastasis, Colorectal carcinoma, Neoadjuvant therapy, Prognosis, Histopathological response

## Introduction

Colorectal carcinoma is one of the most frequent human malignancies, primarily in developed countries [1]. Despite recent advances in therapy, particularly after the introduction of targeted drugs against EGFR and VEGFR [2], mortality remains high for advanced stages, especially for metastatic disease. The best therapeutic option for metastasis amenable to resection is surgery and R0 resection is one of the most important prognostic factors in these patients [3]. Neoadjuvant chemotherapy (NAC) has been proposed as a therapeutic alternative for patients with metastatic disease in whom surgery is technically difficult [4]. In this sense, the objective of therapy is not to completely kill tumor cells, but rather to reduce tumor size and allow surgery [5]. However, some patients do not respond to NAC and some tumors may even progress during it. This can result in a delay in surgery or even make it impossible. For this reason it would be beneficial to know which patients are more likely to respond to therapy in this setting, a fact that has not been widely analyzed in the literature to date.

## Material and Methods

We retrospectively reviewed the electronic files of the patients with colorectal carcinoma treated at the Fundación Jiménez Díaz Hospital in Madrid (Spain). From these we have included in the study those with initially resectable hepatic metastasis that received NAC and were subsequently operated on with disease free margins. After surgery they received standard adjuvant therapy. We have collected general demographic and clinical data and also data from the primary tumor (location, differentiation grade, vascular

**Citation:** Cortés Guiral D, Fernández-Aceñero MJ, García-Olmo D, Pastor Idoate (2015) Factors Predicting Response to Neoadjuvant Therapy of Hepatic Metastasis from Colorectal Carcinoma. Int J Pathol Clin Res 1:009

**Received:** August 14, 2015; **Accepted:** August 31, 2015; **Published:** September 03, 2015

**Copyright:** © 2015 Guiral DC. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

invasion, inflammatory response, TNM staging). We collected the CEA values before NAC. We also reviewed the stained slides of the metastatic hepatic nodules to describe the morphological response to therapy according to Rubbia-Brandt criteria [6]. We did not analyze radiological data of response, due to being inadequately reported in the clinical records of many patients.

We designed a data base in Excel and performed statistical analysis of the results with SPSS 20 for Windows statistical software (IBM corporation). We performed a descriptive analysis and a logistic regression model to find which factors can help predict response to therapy.

The permission for this study has been obtained from the Ethical Committee on Scientific Investigation of our hospital. This study

is in accordance to national regulations regarding personal data protection.

## Results

Inclusion criteria for the present study were met by 50 patients. Table 1 summarizes the general characteristics of the series. Table 2 summarizes the histopathological features of the primary colon tumors, according to their response. In our series, 3 patients showed a complete response (6%), 33 showed a minor response (66%) and 14 (28%) showed a major response.

The statistical analysis of the factors influencing response was made considering both patients with complete and major response. We compared the mean values of the quantitative variables with Student's T test and estimated the association between qualitative variables with Chi-Square test. We only found significant differences in the mean values of CEA ( $p = 0.01$ ), which were significantly higher in minor responders. For subsequent analysis we classified the patients in those with CEA values 5 ng/ml or less and those with CEA higher than 5 ng/ml, table 3 summarizes the data from this analysis.

Lastly, we performed a logistic regression model considering all the demographic and histopathological data that could influence response and found that only CEA preoperative levels ( $p = 0.02$ ) significantly influenced response of the hepatic metastasis to NAC and histological differentiation of the tumor showed a trend toward significance ( $p = 0.07$ ). Well differentiated tumors tended to respond less to NAC than poorly differentiated ones.

## Discussion

NAC has emerged in recent times as a useful therapeutic approach to the management of hepatic metastasis from colorectal malignant

**Table 1:** General characteristics of the 50 patients meeting inclusion criteria

	Percentage
Gender	Male: 54% Female: 46%
Age	62.3 (11.3)
Comorbidities	No: 70% Yes: 30%
Family history of cancer	No: 74% Yes: 26%
Personal history of cancer	No: 82% Yes: 18%
Location of primary tumor	Rectosigmoid: 66% Other: 44%
T stage of primary	T1: 2% T2: 10% T3: 80% T4: 8%
N stage of primary	N0: 50% N1: 30% N2: 20%
Data are expressed either as percentages or mean (SD), as indicated	

**Table 3:** Univariate analysis: statistically significant associations

	Major responders	Minor responders	p value
CEA level	$\leq 5$ 6 (80%) $> 5$ 2 (20%)	$\leq 5$ 1 (5%) $> 5$ 20 (95%)	0.001
Differentiation	Low grade 4 (31%) High grade 9 (69%)	Low grade 29 (85%) High grade 5 (15%)	0.001

**Table 2:** Histopathological features of the primary tumors

	Complete response (n = 3)	Major response (n = 10)	Minor response (n = 34)
Differentiation	Low grade 1 (50%) High grade 1 (50%)	Low grade 3 (30%) High grade 7 (70%)	Low grade 27 (84.5%) High grade 5 (15.5%)
Location	Colon 0 Sigmoid-rectum 3 (100%)	Colon 3 (30%) Sigmoid-rectum 7 (70%)	Colon 13 (38%) Sigmoid-rectum 21 (62%)
Lymph vessel invasion	Present 0 Absent 2 (100%)	Present 1 (10%) Absent 9 (90%)	Present 8 (25%) Absent 24 (75%)
Lymphohistiocytic Inflammatory reaction	Absent 1 (50%) Scarce 1 (50%) Intense 0	Absent 5 (50%) Scarce 3 (30%) Intense 2 (20%)	Absent 17 (53%) Scarce 6 (19%) Intense 9 (28%)
Leading front	Pushing 0 Infiltrative 2 (100%)	Pushing 3 (30%) Infiltrative 7 (70%)	Pushing 9 (28%) Infiltrative 23 (72%)
Desmoplasia	Absent 2 (100%) Present 0	Absent 7 (70%) Present 3 (30%)	Absent 28 (87.5%) Present 4 (12.5%)
Mucin production	Absent 2 (100%) Present 0	Absent 10 (10%) Present 0	Absent 27 (84.4%) Present 5 (15.6%)
pT stage	T1 0 T2 1 (33%) T3 2 (64%) T4 0	T1 1 (10%) T2 1 (10%) T3 7 (70%) T4 1 (10%)	T1 0 T2 2 (6%) T3 29 (85%) T4 3 (9%)
pN stage	N0 3 (100%) N1 0 N2 0	N0 4 (40%) N1 2 (20%) N2 4 (40%)	N0 15 (44%) N1 13 (38%) N2 6 (8%)
*Histopathological data of the primaries were missing in one patient from the complete response group and two from the minor response group			



tumors. It is well known that almost 50% of the patients with colon carcinoma will develop metastasis during follow-up and to improve survival it is essential to design aggressive therapeutic schemes that try to reduce the burden of disease and enhance response to adjuvant chemotherapy and also to targeted drugs [2]. Surgery of the metastasis is the best therapeutic alternative [3], but at times it may be difficult to achieve complete resection or surgery may be technically complex leading to some groups advocating the use of NAC to make resection more manageable.

NAC is usually based on oxaliplatin or irinotecan associated to fluoropyrimidines. Some schemes also employ targeted drugs (namely, anti-EGF and anti-VEGF drugs) in this setting. The response to therapy is usually followed with serial CT scans during NAC, for progression of disease could even make surgical resection impossible or recommend NAC cessation. However, it is rather clear than the RECIST criteria relying on size reduction are not well correlated to the histopathological response [7] and also that this criteria does not precisely predict prognosis after resection. In this sense radiologists have developed the so called morphological criteria [8,9], which seem to correlate better with histopathology and not only takes into account the shrinkage of the tumor, but rather also the changes in the radiological features of the metastatic nodules in the CT scan.

NAC combined with radiotherapy (NACRT) is a frequent therapeutic scheme for rectal tumours [10]. Pathological response to NACRT is one of the most important prognostic factors according to the literature in these patients. Schemes to evaluate response are varied [11], but most recent reports use the one recommended by the American College of Pathologists [12]. Over the years histopathological response to NAC of hepatic metastasis has also been evaluated with varying criteria. However, in 2008 Rubbia-Brandt proposed a new system to classify response creating three groups (complete, major and minor response), which showed good correlation with prognosis [6] and has been widely adopted. Rubbia-Brandt's criteria showed good correlation with morphological data of response in radiological follow-up and this is important for clinicians' decision making.

Besides, there are many reports trying to predict response of rectal carcinomas to therapy, for therapy is not devoid of adverse effects and it would be important to define patients that can benefit more from NAC [13]. Despite the many reports about the prognostic significance of histopathological response of metastasis, we have only found one previous report trying to predict response of the hepatic metastasis, as we intend to do in the present study [14]. In this report, Blazer et al. established that histopathological response of hepatic metastasis to NAC influenced prognosis (33% of patients with minor response were alive at 5 years follow-up as opposed to 75% of patients with major response), but also tried to determine which factors could influence response. In a multivariate analysis on 305 patients undergoing hepatic resection after NAC they concluded that CEA preoperative levels, tumor size and use of bevacizumab were significantly associated to histopathological major response. After this report, there have been no further ones specifically analyzing this issue. In our small series of 50 patients we have also tried to define which factors can significantly influence response to NAC. In the univariate analysis both CEA preoperative levels and differentiation of the primary tumor were significantly associated to major response, but in the multivariate logistic regression model, only CEA levels showed independent predictive value of response. Blazer's report does not mention the differentiation grade of the tumor in his analysis. Tumor size was not adequately reported in the clinical records of our patients and bevacizumab in our series was only administered in 11 patients (22%) not permitting conclusions to be obtained from these two factors.

Some reports have tried to determine the recurrence risk of patients with resected metastasis from colon carcinoma, even establishing predictive algorithms [15,16]. It would be beneficial to design similar algorithms for prediction of response to therapy with hopes to improve selection of the best candidates for this therapy as

it is done in rectal carcinoma. In the near future molecular factors will probably gain interest in this area, as in many other oncologic fields [17].

The present study has several drawbacks, which deserve to be mentioned. The most important one is the small number of cases, although the results are similar to those obtained by Blazer [13] who had a much larger number of cases. Also, the retrospective nature has made it impossible to retrieve information regarding image data, mainly morphological changes in the nodules, which have become an interesting factor to predict response. It seems clear, however that prospective adequately powered studies are necessary to settle this matter and avoid NAC in patients less likely to respond, therefore reducing toxicity and allowing an earlier resection of the lesions if possible.

## Acknowledgments

This work was partially funded with a grant of the Spanish Economy and Competitivity Ministry through the Program RETOS for 2014.

## References

1. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A (2011) Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin* 61: 212-236.
2. Ribero D, Wang H, Donadon M, Zorzi D, Thomas MB, et al. (2007) Bevacizumab improves pathologic response and protects against hepatic injury in patients treated with oxaliplatin-based chemotherapy for colorectal liver metastases. *Cancer* 110: 2761-2767.
3. Pawlik TM, Scoggins CR, Zorzi D, Abdalla EK, Andres A, et al. (2005) Effect of surgical margin status on survival and site of recurrence after hepatic resection for colorectal metastases. *Ann Surg* 241: 715-72.
4. Benoist S, Brouquet A, Penna C, Julié C, El Hajjam M, et al. (2006) Complete response of colorectal liver metastases after chemotherapy: does it mean cure? *J Clin Oncol* 24: 3939-3945.
5. Minagawa M, Yamamoto J, Kosuge T, Matsuyama Y, Miyagawa S, et al. (2007) Simplified staging system for predicting the prognosis of patients with resectable liver metastasis: development and validation. *Arch Surg* 142: 269-276.
6. Rubbia-Brandt L, Giostra E, Brezault C, Roth AD, Andres A, et al. (2007) Importance of histological tumor response assessment in predicting the outcome in patients with colorectal liver metastases treated with neo-adjuvant chemotherapy followed by liver surgery. *Ann Oncol* 18: 299-304.
7. Rothe JH, Grieser C, Lehmkuhl L, Schnapauff D, Fernandez CP, et al. (2013) Size determination and response assessment of liver metastases with computed tomography—comparison of RECIST and volumetric algorithms. *Eur J Radiol* 82: 1831-1839.
8. Shindoh J, Loyer EM, Kopetz S et al. (2012) Optimal morphologic response to preoperative chemotherapy: an alternate outcome end point before resection of hepatic colorectal metastases. *J Clin Oncol* 30: 4566-4572.
9. Chun YS, Vauthey JN, Boonsirikamchai P, Maru DM, Kopetz S, et al. (2009) Association of computed tomography morphologic criteria with pathologic response and survival in patients treated with bevacizumab for colorectal liver metastases. *JAMA* 302: 2338-2344.
10. Yoon WH, Kim HJ, Kim CH, Joo JK, Kim YJ, et al. (2015) Oncologic impact of pathologic response on clinical outcome after preoperative chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *Ann Surg Treat Res* 88: 15-20.
11. Mandard AM, Dalibard F, Mandard JC, Marnay J, Henry-Amar M, et al. (1994) Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma. Clinicopathologic correlations. *Cancer* 73: 2680-2686.
12. Mace AG, Pai RK, Stocchi L, Kalady MF (2015) American Joint Committee on Cancer and College of American Pathologists regression grade: a new prognostic factor in rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 58: 32-44.
13. Blazer DG 3rd, Kishi Y, Maru DM, Kopetz S, Chun YS, et al. (2008) Pathologic response to preoperative chemotherapy: a new outcome end point after resection of hepatic colorectal metastases. *J Clin Oncol* 26: 5344-5351.
14. Kalady MF, de Campos-Lobato LF, Stocchi L, Geisler DP, Dietz D, et al. (2009) Predictive factors of pathologic complete response after neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer. *Ann Surg* 250: 582-589.
15. Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH (1999) Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann Surg* 230: 309-318.
16. Malik HZ, Prasad KR, Halazun KJ, Aldoori A, Al-Mukhtar A, et al. (2007) Preoperative prognostic score for predicting survival after hepatic resection for colorectal liver metastases. *Ann Surg* 246: 806-814.
17. Wanebo HJ, LeGolvan M, Paty PB, Saha S, Zuber M, et al. (2012) Meeting the biologic challenge of colorectal metastases. *Clin Exp Metastasis* 29: 821-839.



Contents lists available at ScienceDirect

## Pathology – Research and Practice

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/prp](http://www.elsevier.com/locate/prp)

## Original Article

## Morphological aspects of the hepatic response to neoadjuvant therapy

M.J. Fernández-Aceñero<sup>a,\*</sup>, D. Cortés-Guiral<sup>b</sup>, L. Estrada Muñoz<sup>a</sup>, J. Martínez-Useros<sup>c</sup>, C. Pastor-Idoate<sup>b</sup><sup>a</sup> Department of Surgical Pathology, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain<sup>b</sup> Department of Surgery, University Hospital Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain<sup>c</sup> Department of Translational Oncology, University Hospital Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 22 March 2015

Received in revised form 19 May 2015

Accepted 10 June 2015

## Keywords:

Hepatic metastasis

Colorectal carcinoma

Neoadjuvant therapy

Histopathological response

Fibrosis

Mucin

Targeted drugs

## ABSTRACT

**Introduction:** Therapy of metastatic colorectal carcinoma has greatly evolved in recent years. Surgery is still the best curative option and can improve survival in stage IV disease. Neoadjuvant chemotherapy (NAC) has emerged as a widely used therapeutic option before surgery. Pathologists have developed several systems to grade response, mainly adapting the grading systems used for the response in primary esophageal or rectal tumors. There are many reports confirming the prognostic utility of these grading systems. However, there have been fewer references to the potential significance of the pattern of histological response. The objective of the present study is to describe the histopathological lesions found in the tumor bed after NAC and their potential significance in terms of prognosis.

**Material and methods:** We reviewed the files of patients with colorectal carcinoma that developed hepatic metastasis during follow-up and received NAC before surgical resection of metastasis. We gathered demographic, analytical and morphological data of the cases, and also reviewed the hepatic resection samples to measure the pathological response to chemotherapy according to Blazer's criteria, and to define the predominant patterns of response (mucin pools, fibrosis or necrosis). We also determined the presence of satellitosis, measured the thickness of the tumor-normal interface (TNI) as proposed by Maru et al., and searched for vascular and bile duct invasion. All these pieces of information were collected in an Excel database and analyzed with SPSS 20.0 for Windows statistical package. The outcome measures were disease-free survival and overall survival in months since the first surgery to resect metastatic disease.

**Results:** Fifty patients fulfilled the inclusion criteria for the present study. All of them had received a chemotherapeutic regimen mainly based on platinum, associated or not with targeted drugs (18% received anti-EGFR drugs and 24% anti-VEGFR drugs). Of the primaries, 66% were of sigmoid-rectal origin, and 32% of the cases showed a major histopathological response to therapy (including 3 cases with a complete response). In 76% of the tumors, the predominant histological pattern was necrosis, followed by fibrosis (57.4%). Mucin pools were the predominant feature in 23.4% of the tumors. We found satellitosis (microscopic tumor nodules separated by more than 1 mm from the principal tumor) in 53.2% of the cases. A prominent inflammatory reaction was found in 19% of the cases, and it was mainly composed of lymphocytes and histiocytes (70% of the cases). Vessel invasion was seen in 30% of the cases, and perineural invasion was only found in 4%. We found no case of bile duct invasion by the tumor. The thickness of the TNI measured less than 2.5 mm in 60% of the present series. Statistical analysis of the series revealed that thickness of the tumor-liver interface was significantly associated with recurrence and overall survival. We found a significant association between response and thickness of the tumor-normal liver interface. In our series, the presence of satellitosis tended to predict a shorter DFS. The comparison of Kaplan–Meier curves with the log-rank test showed a significant association between overall survival and the presence of mucin pools and fibrosis in the tumor bed. The other histopathological factors did not predict differences in prognosis. These differences were independent of the use of targeted drugs.

**Abbreviations:** NAC, neoadjuvant chemotherapy; TNI, tumor-normal interface; EGFR, epidermal growth factor receptor; VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor.

\* Corresponding author at: Department of Surgical Pathology, Hospital Clínico San Carlos, C/ Profesor Martín Lagos s/n, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 9130303841; fax: +34 913303033.

E-mail address: [mgg10167@gmail.com](mailto:mgg10167@gmail.com) (M.J. Fernández-Aceñero).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2015.06.007>

0344-0338/© 2015 Elsevier GmbH. All rights reserved.

**Discussion:** The pathological reports of hepatic metastasis from colorectal carcinoma resected after NAC usually indicate only the number, the size and the response of the tumor cells to therapy, apart from the distance to the resection margin of the specimen. Few reports have analyzed the possible prognostic significance of the different kinds of histopathological responses. The results of the present study indicate that those tumors with extensive pools of mucin show a significantly worse prognosis as compared to tumors with less mucin secretion. Fibrosis indicates a better prognosis, except when desmoplasia is present. Our study further supports the prognostic significance of the thickness of the tumor-hepatic interface. We conclude that pathology reports should specify the kind of histopathological response to therapy, besides grading it, because this might add significant prognostic information.

© 2015 Elsevier GmbH. All rights reserved.

## 1. Introduction

Colorectal carcinoma is one of the most frequent human malignancies, largely in developed countries [1]. Despite recent advances in therapy, mainly after the introduction of targeted drugs against EGFR and VEGFR [2], mortality remains high for advanced stages, especially for metastatic disease. The best therapeutic option for metastasis amenable to resection is surgery [3], but neoadjuvant chemotherapy (NAC) is being increasingly used as a therapeutic alternative for patients with metastatic disease before resection [4], and it can achieve 40–60% survival at 5 years, similar to stage III disease. Several schemes have been developed to grade histopathological response of the metastatic tumor to NAC [5] and this factor is very important to help predict the outcome of the patients [6]. At present, pathological reports usually report only on the number of metastatic nodules, their size, the distance to the resection margin and the grade of response, but the pattern of response can vary widely between patients, and there might be some pathological aspects that increase the prognostic significance of the pathological reports. The aim of the present study is to analyze some morphological aspects of hepatic metastasis that are not usually considered in the pathological report, and to determine their possible prognostic influence.

## 2. Material and methods

We retrospectively reviewed the electronic files of the patients with colorectal carcinoma treated at the Fundación Jiménez Díaz Hospital in Madrid (Spain). From these, we included in the study those with initially resectable hepatic metastasis that received NAC and were subsequently operated on with disease free margins. After surgery, they received standard adjuvant therapy. For the objectives of the present study, we only included the specimen of the first resection (some patients were operated on several times after local recurrences of the hepatic lesions), and in case of multiple nodules, we calculated a mean value for the quantitative data and estimated the predominant pattern as an average value for all the nodules together. In our hospital, the metastasis resection specimens are completely embedded in paraffin. In cases with complete response, we performed serial sections and mucin stains, but we did not perform immunohistochemistry to search for cytokeratin-positive cells.

We collected general demographic and clinical data and also data from the primary tumor (location, differentiation grade, vascular invasion, inflammatory response, TNM staging). Besides, we reviewed the stained slides of the metastatic hepatic nodules to describe the morphological response to therapy according to Blazer criteria [6], but also other morphological features, such as vessel invasion, bile duct invasion, hepatic parenchyma invasion, presence of satellitosis (defined as a metastatic nodule separated more than 1 mm from the main nodule), differentiation grade of the metastatic nodule, inflammatory reaction within the nodule and kind of inflammatory response. We also measured the thickness

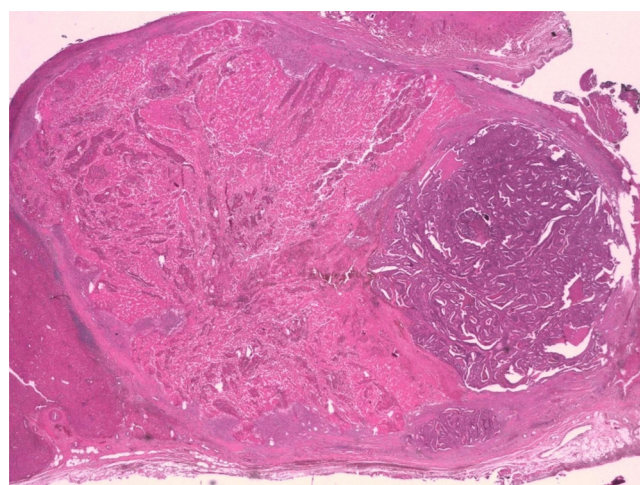
of the tumor at the tumor-normal interface (TNI), as proposed by Maru et al. [7] Prognosis of the patients was measured with the time to recurrence (disease free survival; DFS) and with the time to death secondary to the tumor (overall survival; OS), both expressed in months. All histopathological features were reviewed by two independent pathologists (MJFA and LE) blinded to the outcome of the patients. In case of discordance, the cases were reviewed together by the two pathologists to reach consensus. Concordance rate ranged between 75% and 80%.

Data were analyzed with SPSS for Windows 20.0 statistical package (IBM corporation). Univariate association between pathological and outcome variables was evaluated by chi-squared (or Fisher's exact) test. For survival analysis, we compared the Kaplan–Meier curves with the log-rank test. Due to the small sample size, no multivariate regression model was adjusted. The level of statistical significance was defined as a *p* value less than 0.05, as usual.

Permission for this study was obtained from the Ethical Committee on Scientific Investigation of our hospital. This study is in accordance with the national Spanish regulations concerning personal data protection.

## 3. Results

Inclusion criteria were fulfilled by 50 patients for the present study. The median follow-up time in this series was 55 months (range: 14–140). Table 1 summarizes the general characteristics of the series. Table 2 summarizes the histopathological features found in the metastatic nodule (Figs. 1–3). For the purpose of this study, we constructed an operator–receiver curve to determine the best cut-off point for the quantitative values and used the calculated



**Fig. 1.** Hepatic metastasis showing major response to NAC (H&E stained slide,  $\times 40$ ). Note the presence of tumor in less than 50% of the tumor bed and the extensive areas of necrosis.



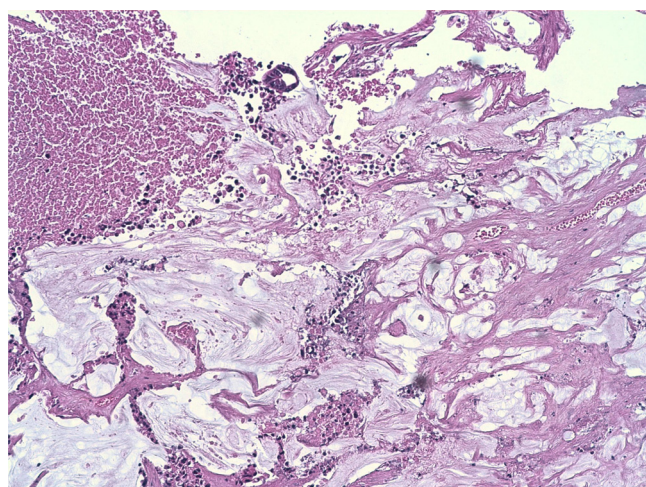
**Table 1**  
General characteristics of the 50 patients fulfilling inclusion criteria.

	Percentage
Gender	Male: 54% Female: 46%
Age	62.3 (11.3)
Comorbidities	No: 70% Yes: 30%
Family history of cancer	No: 74% Yes: 26%
Personal history of cancer	No: 82% Yes: 18%
Location of primary tumor	Rectosigmoid: 66% Other: 44%
T stage of primary	T1: 2% T2: 10% T3: 80% T4: 8%
N stage of primary	N0: 50% N1: 30% N2: 20%
Histopathological response to therapy	Major: 28% (complete 3 cases) Minor: 72%
Recurrence	No: 12% Yes: 88%
DFS	20.9 (14.3)
Death	No: 36% Yes: 62%
OS	52.5 (36.5)

Data are expressed either as percentages or mean (SD), as indicated.

value (2.5 mm) to divide our series in two groups: patients with TNI measuring 2.5 mm or less (60%) and patients with TNI over this value.

Of the primaries, 66% were of sigmoid-rectal origin, and 32% of the patients showed a major histopathological response to therapy (including 3 cases with a complete response). In 76% of the tumors the predominant histological pattern of tumor response was necrosis, followed by fibrosis (57.4%). Mucin pools were the predominant feature in 23.4% of the tumors. We found satellitosis (microscopic tumor nodules separated by more than 1 mm from the principal tumor) in 53.2% of the cases. A prominent inflammatory reaction



**Fig. 2.** Presence of mucin pools at the tumor bed. Small nests of tumor cells within the mucin can be seen. Despite the major response found in these cases, these patients have shown a worse prognosis in terms of OS (H&E stained slide, ×200).

**Table 2**  
Histopathological features of the metastasis after NAC.

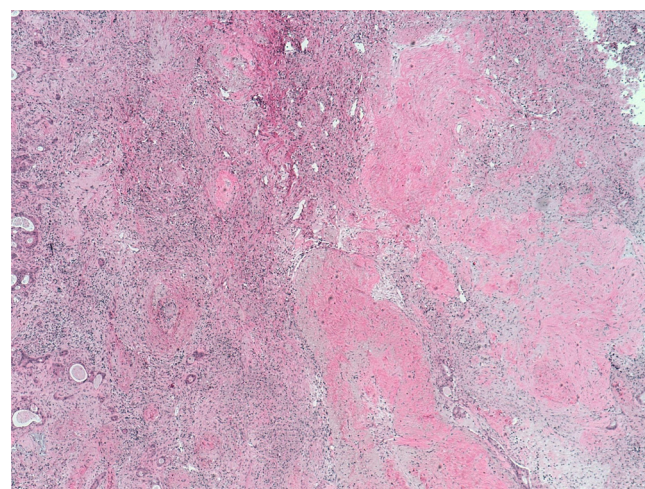
Feature	Percentage of cases
Differentiation	Low grade (well-moderate differentiation) 91% High grade (poor differentiation) 9%
Border of the lesion	Irregular 31% Smooth (encapsulated) 69%
Vessel invasion <sup>a</sup>	Absent 70% Present 30%
Lymphohistiocytic inflammatory reaction	Absent 32% Scarce 49% Intense 19%
Main cells in the inflammatory infiltrates (n = 35)	Lymphocytes-histiocytes 83% Polimorphonuclears 17%
Fibrosis	Absent 42.6% Present collagenous 27.7% Present desmoplasia 29.7%
Mucin production	Absent 76.6% Present 23.4%
Perineural invasion <sup>b</sup>	Absent 96% Present 4%
Necrosis	Absent 24% Present 76%
Thickness at the tumor-normal interface	≤2.5 mm 60% >2.5 mm 40%
Calcification	Absent 88% Present 12%
Satellitosis <sup>c</sup>	Absent 46.8% Present 53.2%

<sup>a</sup> Vascular invasion was defined as the presence of tumor cells inside the lumen of a vessel and attached to the vessel wall. We made no distinction between lymph and systemic vessels.

<sup>b</sup> Perineural invasion was defined as the presence of tumor cells beneath the fibrous capsule of a nerve.

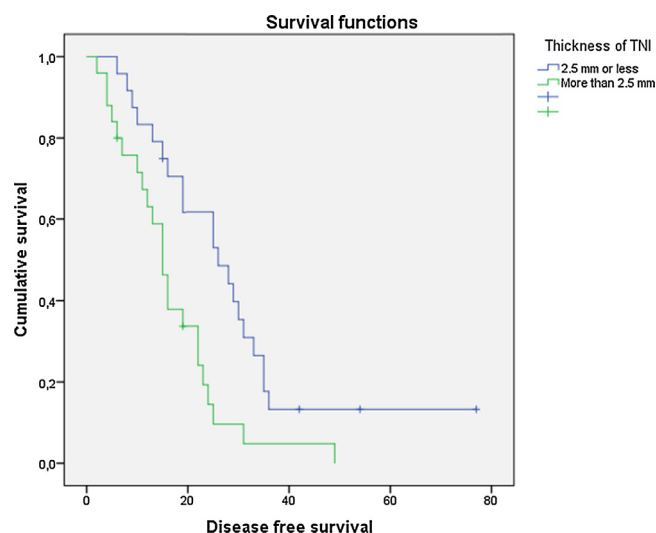
<sup>c</sup> For the purpose of the present study, satellitosis was defined as microscopic tumor nodules separated more than 1 mm from the main nodules, excluding portal or hepatic vein invasion.

was found in 19% of the cases, and it was mainly composed of lymphocytes and hystiocytes (70% of the cases). Vessel invasion was seen in 30% of the cases, and perineural invasion was only found in 4%. We found no case of bile duct invasion by the tumor.



**Fig. 3.** Fibrosis at the tumor bed. Note the collagenous fibrotic tissue surrounding the nests of tumor cells in this case of major response to therapy. The presence of collagenous stroma indicates a good prognosis in our series (H&E stained slide, ×100).





**Fig. 4.** Kaplan–Meier curves comparing the survival of patients with TNI values over 2.5 mm or smaller.

We performed a univariate statistical analysis to find possible associations between the different histopathological features. Not surprisingly, the thickness of the TNI was significantly associated with the regression grade ( $p=0.03$ ) and, as expected, tumors with major response showed significantly smaller values of this parameter. Besides, the thickness of the TNI was significantly associated with the presence of a significant inflammatory reaction ( $p=0.01$ ), and no tumor with TNI values over 2.5 mm showed a prominent inflammatory reaction, as opposed to 32% of the tumors with smaller TNI values. Our study did not find any further significant association between TNI thickness and other histopathological features.

We found a statistically significant association between regression grade and the presence of a pseudocapsule in the tumor ( $p=0.009$ ), for 33% of the nodules with a pseudocapsule showed major response as compared to no case with an infiltrative growth pattern. The inflammatory reaction was significantly more intense in cases with a major response to therapy ( $p=0.03$ ).

As for prognosis, we found a significant association between TNI and disease-free survival ( $p=0.01$ ; Fig. 4) and overall survival ( $p=0.05$ ). The median overall survival of patients with a TNI thickness measuring 2.5 mm or less was 77 months (mo) as opposed to 54 mo for the patients with TNI higher than 2.5 mm. Besides, overall survival was significantly associated with the N-stage of the primary tumor (29.8 mo vs. 16.5 mo for node negative and positive tumors, respectively;  $p=0.004$ ) and with the presence of fibrosis ( $p=0.04$ ). The median survival of patients with no fibrosis in the metastatic nodule was 4.1 mo as opposed to 7.1 mo for patients with a collagenous fibrosis and 1.8 mo for those lesions with desmoplasia. We also found a trend toward significance in the association between overall survival and the presence of mucin pools as the most prominent feature in the metastatic nodule after NAC (23.5 mo vs. 15.8 mo;  $p=0.07$ ) and also between satellitosis and disease-free survival ( $p=0.07$ ). Our study showed no prognostic influence of the rest of the features included in the analysis.

#### 4. Discussion

It is well known that almost 50% of the patients with colon carcinoma will develop metastasis during follow-up. Survival has greatly improved in recent decades due to the design of aggressive therapeutic schemes that try to reduce the burden of disease and enhance response to adjuvant chemotherapy and also to targeted

drugs [8]. Surgery of the metastasis is the best curative therapy [3], but in some cases, it can be preceded by neoadjuvant chemotherapy (NAC). NAC is usually based on oxaliplatin or irinotecan associated with fluoropyrimidines. Some schemes also employ targeted drugs (namely, anti-EGF and anti-VEGF drugs) in this setting. The response to therapy is usually followed by serial CT scans during NAC, for progression of disease could even make surgical resection impossible or recommend NAC cessation. However, it is rather clear that the RECIST criteria relying on size reduction are not well correlated with the histopathological response and also do not precisely predict prognosis after resection. In this sense, radiologists have developed the so called morphological criteria, which seem to correlate better with histopathological response [9].

There is no a clear consensus in the pathologic literature as to what is the essential data that should be included in a pathology report of the hepatic metastasis resection specimen. At present, most pathologists include the number and size of the nodules and also the distance to the surgical resection margin as the main features to guide prognosis and therapy. R0 resection is one of the most important prognosticators after hepatic metastases surgery. However, there has been much discussion as to what could be considered a safe margin. Several studies have confirmed the presence of satellitosis (microscopic metastases far from the main radiologically visible nodules) in the resection specimens of hepatic metastases. If surgeons do not completely resect these nodules, they could lead to an early relapse of the tumor in the hepatic bed. One study [10] showed that the density of micrometastasis was higher in the area located less than 1 cm from the principal nodule, and this led to the recommendation of a 1 cm free margin to improve survival. However, recent reports indicate that 4 mm could be a secure enough margin, mainly if adjuvant therapy is employed after surgery [11]. If resection is technically feasible, the margins should be as wide as possible, but in technically difficult cases, it is probably possible to obtain similar outcomes when R1 resections receive adjuvant chemotherapy. The present study has only included cases with complete resection of metastatic nodules, but we have shown that the presence of satellitosis tends to associate with a shorter DFS. This result is in accordance with the reported literature that shows that satellitosis is significantly associated with local relapses and also with shorter survival [12].

In addition, pathologists have developed regression grading schemes, much in the same way that is done for the neoadjuvant therapy of the primary tumor. There have been at least five reports [5,6,11] analyzing the prognostic influence of the regression grade of hepatic metastasis after NAC, and all of them have confirmed that major response predicts a better prognosis. However, the criteria employed to define response have not been homogeneous between the different groups. Rubbia-Brandt initially described a five-tiered system to evaluate response, but she performed her analysis by comparing only three grades [5]. In most reports, it is not completely clear if the pathologists embed the whole specimen from the metastatic nodules and how they manage the presence of multiple metastases. All these aspects are essential, mainly if we are to consider the case as a complete response. Lack of whole embedment could lead to mix up cases with a total and a major response or even miss areas with poorer response. It is not infrequent to find a major response in the largest nodules and a minor response in the smaller lesions, and this should be clearly recorded in the pathology report and stated specifically in the publications on this matter. In our study, we did not find any significant heterogeneity between the nodules (only 4% of the cases showed it). Some authors have reported response employing the same criteria used to grade response of the primary tumor [11], basically based on the relative percentage between viable tumor cells and fibrosis. These rather subjective systems can be difficult to reproduce, and they depend greatly on the experience of the pathologists. We

consider that pathologists should embed the whole metastatic nodules, make serial sections in cases of complete response (as has been proposed to grade response after NAC in gastric tumors), and employ the most objective response grading systems. In this sense, the system proposed by Blazer et al. into complete response (total absence of tumor cells), major response (less than 50% tumor cells) and minor response (more than 50% of tumor cells) seems to be a more reproducible scheme, and these authors have confirmed its prognostic utility [6]. The Spanish Society of Pathologists [13] has recently issued a consensus document, including all these aspects for specimen handling and reporting in hepatic metastases.

Colorectal metastatic cells can spread within the liver through different ways. They can invade veins, lymph vessels and also the bile duct. These different spread patterns have not been clearly distinguished in the world literature, and in some reports, there is even some confusion between satellitosis and intrahepatic spread [12], which can make it difficult to compare the findings of the different groups. Besides, most reports have been based on hematoxylin–eosin stained slides, which do not allow for an accurate distinction between veins and lymph vessels. To date, in only one report has been applied immunohistochemistry for D2-40 (podoplanin) to determine the exact spread pattern. A recent literature review [11] indicates that portal vein invasion is associated with a poorer overall survival, but this has not been shown for hepatic vein invasion. In a previous review, 12% of 170 patients showed invasion of lymph vessels and had a significantly worse prognosis in terms of survival. In the present series of 50 patients, we found no significant association between vessel invasion and prognosis in terms of overall and disease free survival. We did not differentiate between lymph vessels and veins for the aims of the present study.

Perineural invasion is another way of tumor spreading, both within and outside the liver. Few series have analyzed this factor, but in a report by Yamamoto et al., they confirmed that perineural invasion was significantly associated with worse prognosis [12]. The rate of perineural invasion in this report was 14%, much higher than the 4% we found in our series. Our study does not seem to confirm this prognostic influence of perineural invasion, but the results are limited due to the lower rate of this finding.

Several authors have analyzed the possible prognostic significance of a fibrous pseudocapsule around the metastatic nodules. The results from Okano et al. [14] indicate that a thick capsule is significantly associated with an improved survival at 5 years (88% vs. 31% for patients with no pseudocapsule). These authors found a fibrous pseudocapsule in 61% of the cases, a rate that is similar to the 70% we found in our own cases. The 5-year survival in patients with a pseudocapsule in our series was 73% as opposed to 54% in non-encapsulated lesions, a difference that did not reach statistical significance, probably due to the small sample size.

In our study, necrosis was the most frequent pattern of histopathological change in hepatic tumors after NAC. However, it is very difficult to ascertain whether or not necrosis truly represents a response to therapy or is just a sign of rapid tumor growth. In fact, many untreated metastases show extensive necrosis. Lin-Chang et al. [15] distinguished between the necrosis associated with NAC that was due to the induction of apoptosis of the tumor cells and the necrosis associated to ischemia that can be found in untreated resected specimens. Nevertheless, the presence of necrosis should lead to consider a major response in many grading systems, and sometimes it is not easy to assure that necrosis is really a response to therapy. In the present study, necrosis was not significantly associated with prognosis.

Few studies have specifically analyzed the presence and the pattern of fibrosis after NAC. In this series, we found that patients with collagenous fibrosis showed a significantly better prognosis than patients with no fibrosis and even better than patients with

desmoplasia. Desmoplasia is also found in the primary colorectal tumors and is considered a sign of bad prognosis [16], but to date, no report has shown the same for metastasis. There is a trend that considers fibrosis as a sign of tumor response to therapy, but this is only the case when we consider collagenous poorly cellular fibrosis, but not when we face desmoplasia.

Few studies have considered the prognostic influence of mucin in the tumor bed, but grading systems usually consider that the presence of mucin pools with few tumor cells is suggestive of a major response and, subsequently, indicates a better prognosis. As it is also the case with regression systems for the primary tumors, if only mucin pools remain, the response should be graded as complete. To the best of our knowledge, this report is the first to analyze specifically the prognostic influence of mucin in the tumor bed after NAC. We found that if the predominant histopathological feature after NAC is mucin pools, prognosis of the patients is significantly worse independently of the regression grade. In our series, none of the primaries were mucin-secreting colloid carcinomas or signet ring carcinomas (all the primary tumors were enteroid large intestine adenocarcinomas). One could argue that similar to what happens in primary tumors, mucin production indicates a more aggressive biological behavior. However, this has not been previously shown for metastasis, and our results should be confirmed by conducting larger studies.

No report has specifically analyzed the possible prognostic influence of inflammatory reaction within the metastatic hepatic nodules. As it is well known, intratumoral lymphocytic response within colorectal carcinomas is a sign of better prognosis, as is also the presence of eosinophils [17], and inflammatory response to the tumor should also be included in the pathology reports of colorectal carcinoma. In this series, we only found a significant association between inflammatory reaction and TNI, but no statistically significant association with prognosis.

Lastly, in this study, we also measured the prognostic influence of the TNI, a factor that was first reported by Maru et al. in 2010 [7] and subsequently confirmed in a small series of cases from our group [18] and in a large review by Brouquet [13]. In this study, we increased the number of cases and confirmed that TNI values over 2.5 mm were significantly associated with a shorter DFS and OS. Besides, we showed the association between this factor and response to therapy. The cut-off point varies among the different reports, so for the moment, if this factor is to be reported in the pathology final report, it should be better measured as a quantitative data in millimeters. The recommendations for TNI measuring are detailed elsewhere [7,18].

The present study has several drawbacks that deserve to be mentioned. The most important one is the small number of cases. Despite the series being small, the patients are rather homogeneous, and we consider them representative of standard management of disease in developed countries. Although the small sample size could compromise the power of the study, we found significant differences, which should be confirmed with larger studies. Besides, the present study has only performed a univariate statistical analysis. Better-powered studies should perform a multivariate analysis to establish the possible impact on our conclusions of several clinical and pathological data, with well-known prognostic significance (number of nodes affected, interval between primary and metastasis, CEA level, among others). Also, the retrospective nature is another limitation to the design of the study. Prospective studies should be undertaken to confirm the preliminary results found by our group. Another important drawback of the study is the fact that it takes for granted that the histopathological changes we analyzed are due to therapy. To date, there have been no reports directly comparing the changes that can occur spontaneously in the metastatic nodules with those induced by therapy. Tumors can induce inflammatory reaction and also show mucin

pools and necrosis with no therapeutic intervention. It would be interesting to perform comparative studies of metastasis between treated and non-treated patients to definitely address this issue.

## 5. Conclusion

We conclude that several histopathological factors can be important to determine the prognosis of patients with hepatic metastasis from colorectal carcinoma receiving NAC, besides the usual factors reported in the pathology report. According to our results, fibrosis and mucin in the tumor bed indicate a worse prognosis, and TNI can also predict prognosis independently of the regression grade. Although better powered analysis is needed to confirm our findings, it is our opinion that pathology reports should specifically describe the main pattern of histopathological response to therapy, the presence of intrahepatic invasion, the border of the nodules, and the TNI. A standardized system for specimen handling and reporting, accepted and recommended by the International Pathologists Societies, could allow for a better classification of the risks of relapse and also improve the selection of therapies after hepatic metastasis resection in this large and complex group of patients.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest for the present study.

## References

- [1] R. Siegel, E. Ward, O. Brawley, A. Jemal, Cancer statistics 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths, *CA Cancer J. Clin.* 61 (2011) 212–236.
- [2] D. Ribero, H. Wang, M. Donadon, D. Zorzi, M.B. Thomas, C. Eng, Bevacizumab improves pathologic response and protects against hepatic injury in patients treated with oxaliplatin-based chemotherapy for colorectal liver metastases, *Cancer* 110 (2007) 2761–2767.
- [3] T.M. Pawlik, C.R. Scoggins, D. Zorzi, E.K. Abdalla, E. Andres, C. Eng, Effect of surgical margin status on survival and site of recurrence after hepatic resection for colorectal metastases, *Ann. Surg.* 241 (2005) 715–722.
- [4] S. Benoist, A. Brouquet, C. Penna, C. Julié, M. El Hajjamm, S. Chagnon, Complete response of colorectal liver metastases after chemotherapy: does it mean cure? *J. Clin. Oncol.* 24 (2006) 3939–3945.
- [5] L. Rubbia-Brandt, E. Giostra, C. Brezault, A.D. Roth, A. Andres, V. Audard, Importance of histological tumor response assessment in predicting the outcome in patients with colorectal liver metastases treated with neoadjuvant chemotherapy followed by liver surgery, *Ann. Oncol.* 18 (2007) 299–304.
- [6] D.G. Blazer, J. Kishi, D.M. Maru, S. Kopetz, Y.S. Chun, M.J. Overman, Pathologic response to preoperative chemotherapy: a new outcome end point after resection of hepatic colorectal metastases, *J. Clin. Oncol.* 26 (2008) 5344–5351.
- [7] D.M. Maru, S. Kopetz, J.C. Boonsirkamchai, A. Agarwal, Y.S. Chun, H. Wang, et al., Tumor thickness at the tumor-normal interface: a novel pathologic indicator of chemotherapy response in hepatic colorectal metastases, *Am. J. Surg. Pathol.* 34 (2010) 1287–1294.
- [8] H.J. Wanebo, M. LeGovan, P.B. Paty, S. Saha, M. Zuber, M.I. D'Angelica, Meeting the biologic challenge of colorectal metastases, *Clin. Exp. Metastasis* 29 (2012) 821–839.
- [9] J.H. Rothe, C. Grieser, L. Lehmkuhl, D. Schnapauff, C.P. Fernandez, M.H. Maurer, Size determination and response assessment of liver metastases with computed tomography – comparison of RECIST and volumetric algorithms, *Eur. J. Radiol.* 82 (2013) 1831–1839.
- [10] T. Wakai, Y. Shirai, J. Sakata, H. Kameyama, H. Nogami, T. Iiai, et al., Histologic evaluation of intrahepatic micrometastases in patients treated with or without neoadjuvant chemotherapy for colorectal carcinoma liver metastasis, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 5 (2012) 308–314.
- [11] N. Knijn, J.A.M. de Ridder, C.J.A. Punt, J.H.W. de Wilt, I.D. Nagtegaal, Histopathological evaluation of resected colorectal cancer liver metastases: what should be done? *Histopathology* 63 (2013) 149–156.
- [12] J. Yamamoto, K. Shimada, T. Kosuge, S. Yamasaki, M. Sakamoto, H. Fukuda, Factors influencing survival of patients undergoing hepatectomy for colorectal metastases, *Br. J. Surg.* 86 (1999) 332–337.
- [13] M. Gómez-Dorronsoro, R. Miguel, L. Ortega, C. Hörndler, J.R. Antúnez, C.M. Villar-Pastor, et al., Recomendaciones para el estudio patológico de las metástasis hepáticas de cáncer colorrectal tras neoadyuvancia, *Consenso Nac. Soc. Española Anat. Patol. Rev. Esp. Patol.* 47 (2014) 90–99.
- [14] K. Okano, J. Yamamoto, T. Kosuge, S. Yamamoto, M. Sakamoto, Y. Nakanishi, et al., Fibrous pseudocapsule of metastatic liver tumors from colorectal carcinoma. Clinicopathologic study of 152 first resection cases, *Cancer* 89 (2000) 267–275.
- [15] H.H. Li-Chang, D.K. Driman, Evaluating necrosis and chemotherapy response in colorectal cancer liver metastases, *Histopathology* 63 (2013) 294–295.
- [16] C.J. Xu, T. Mikami, T. Nakamura, T. Tsuruta, N. Nakada, N. Yanagisawa, S.X. Jiang, I. Okayasu, Tumor budding, myofibroblast proliferation, and fibrosis in obstructing colon carcinoma: the roles of Hsp47 and basic fibroblast growth factor, *Pathol. Res. Pract.* 209 (2013) 69–74.
- [17] M.J. Fernández-Aceñero, M. Galindo-Gallego, J. Sanz, A. Aljama, Prognostic influence of tumor-associated eosinophilic infiltrate in colorectal carcinoma, *Cancer* 88 (2000) 1544–1548.
- [18] M. Abengózar, M.J. Fernández-Aceñero, S. Chaves, A. Celdrán, Prognostic utility of tumor thickness at the tumor-normal interface in chemotherapy-treated hepatic colorectal metastasis, *Pathol. Res. Pract.* 208 (2012) 235–239.



## Accepted Manuscript

Title: CPEB4 immunohistochemical expression is associated to prognosis in stage IV colorectal carcinoma

Authors: D. Cortés-Guiral, C. Pastor-Iodate, C. Díaz del Arco,  
L. del Puerto-Nevado, M.J. Fernández-Aceñero

PII: S0344-0338(16)30735-X

DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.prp.2017.04.020>

Reference: PRP 51798

To appear in:

Received date: 1-12-2016

Revised date: 27-3-2017

Accepted date: 20-4-2017

Please cite this article as: D.Cortés-Guiral, C.Pastor-Iodate, C.Díaz del Arco, L.del Puerto-Nevado, M.J.Fernández-Aceñero, CPEB4 immunohistochemical expression is associated to prognosis in stage IV colorectal carcinoma, Pathology - Research and Practice<http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2017.04.020>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.



**CPEB4 immunohistochemical expression is associated to prognosis in stage IV colorectal carcinoma**

Authors: D. Cortés-Guiral<sup>1</sup>; C. Pastor-Iodate<sup>1</sup>; C. Díaz del Arco<sup>2</sup>; L del Puerto-Nevado<sup>3</sup>; MJ Fernández-Aceñero<sup>1,2</sup>

Departments of Surgery<sup>1</sup>; Surgical Pathology<sup>2</sup> and Traslational Oncology Unit.<sup>3</sup> Fundación Jiménez Díaz<sup>1,3</sup> Hospital Clínico San Carlos,<sup>2</sup> Madrid, Spain

Address for correspondence: Dra. M<sup>a</sup> Jesús Fernández-Aceñero. Department of Surgical Pathology Hospital Clínico San Carlos. Avda Profesor Martín Lagos s/n 28040 Madrid (Spain)

e-mail: [mgg10167@gmail.com](mailto:mgg10167@gmail.com)

## **CPEB4 immunohistochemical expression is associated to prognosis in stage IV colorectal carcinoma**

### **Summary:**

The cytoplasmic polyadenylation element binding protein 4 (CPEB4) is a RNA binding protein and translational regulator. It has been associated with tumor growth, vascularization and invasion and with tumor progression in breast, pancreas and lung carcinomas. To the best of our knowledge only one previous report has analyzed the prognostic value of CPEB4 in an experimental model of colorectal carcinoma. We have reviewed the files of patients with stage IV colorectal carcinoma metastatic to the liver. All the patients had received chemotherapy followed by hepatic metastasis resection and subsequent resection of the colon (liver-first approach). We have gathered demographic, analytical and morphological data of the primary tumors. We have performed immunohistochemical analysis of CPEB4 expression in these tumors and analyzed the potential prognostic value of this protein. 50 patients fulfilled inclusion criteria for the present study. All of them received preoperative chemotherapy based on platinum and also postoperative chemotherapy, with or without targeted drugs (18% received anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) drugs and 24% anti-vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) drugs. 66% of the primaries were of sigmoid-rectal origin. CPEB4 expression was mainly cytoplasmic and it was scored as intense in 46% of the patients. Survival analysis revealed a significant association between progression free survival (PFS) and overall survival (OS) and CPEB4 immunohistochemical expression, which was independent in the multivariate analysis.

CPEB4 behaves as a significant predictor of prognosis in stage IV colorectal carcinoma. The existence of CPEB4 specific inhibitors can open a new way for targeted therapy. Larger prospective studies are needed to confirm our promising results.

**Key words:** hepatic metastasis; colorectal carcinoma; prognosis; CPEB4 expression.

## Introduction:

Colorectal carcinoma is one of the most frequent human malignancies, primarily in developed countries.<sup>1</sup> Despite recent advances in therapy, particularly after the introduction of targeted drugs against epidermal growth factor receptor (EGFR) and vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR),<sup>2</sup> mortality remains high for advanced stages, especially for metastatic disease. The best therapeutic option for metastatic disease amenable to resection is surgery and R0 resection is one of the most important prognostic factors in these patients.<sup>3</sup> Chemotherapy has been proposed as an initial therapeutic alternative for patients with metastatic disease in whom surgery is technically difficult to reduce tumor burden and ease resection.<sup>4</sup> However, most patients with advanced disease will eventually succumb to disease, despite successful initial resection. Therefore, it is very important to find factors predicting prognosis after therapy,<sup>5</sup> for they might help adjuvant therapy selection.

Cytoplasmic polyadenylation element binding proteins (CPEB) are sequence-specific RNA binding proteins, with important roles in RNA transport and translation,<sup>6</sup> that have been related to synaptic plasticity in neurons. For the aims of the present study we have chosen CPEB4, which is a highly conserved sequence specific RNA binding protein that recruits translational repression or polyadenylation machinery to target mRNA. This protein has essential functions in vascularization and has been associated to the evolution of hepatic cirrhosis.<sup>7</sup> Its dysregulation has been shown to be associated with progression in pancreatic carcinoma and glioblastomas,<sup>8</sup> but some data suggest that its role can be opposite in hepatocellular carcinoma, what seems to indicate a complex role in human cancer.<sup>9</sup> Some authors suggest this might be indicative of a complex role in RNA translation and argue for a tissue-specific pattern of action for CPEB4. In this sense experimental work has shown a translocation of CPEB4 to the cell nucleus in response to ischemia and a survival promoting role after ischemic insult in neurons.<sup>6</sup>

To date only one report has analyzed the possible role of CPEB4 expression in colorectal carcinoma in an experimental model.<sup>10</sup> The aim of the present study is to analyze the role of CPEB4 in metastatic colorectal carcinomas.

## Material and Methods:

We retrospectively reviewed the electronic files of the patients with stage IV colorectal carcinoma treated at the Fundación Jiménez Díaz Hospital in Madrid (Spain) between 2005-



2011. From these we have consecutively included in the study all those cases with initially resectable hepatic metastasis that received peroperative chemotherapy and were subsequently operated on with disease free margins (R0 resection). In our hospital all these cases are jointly evaluated in a committee with involvement of radiation therapy oncologists, oncologists, surgeons, radiologists and pathologists. This approach is usually chosen for patients with low hepatic disease burden synchronous to primary colorectal lesions as an alternative to surgery. In general they are patients with unilobar resectable metastasis. Resection could be either hepatectomy or metastasectomy according to clinical criteria. All the patients in the present series had a liver-first approach to the tumor. After surgery they received adjuvant chemotherapy, associated or not with targeted drugs. All the patients that could not be operated or showed R1 disease were excluded from this study.

We have collected general demographic and clinical data and also data from the primary tumor (location, differentiation grade, vascular invasion, inflammatory response, TNM staging). Outcome of the patients was measured with the time to progression (progression free survival defined as the time interval from surgery with curative intention and progression of disease; PFS) and by the time to death due to tumor (overall survival defined as the time interval from surgery with curative intention and death of disease; OS), both in months.

We selected formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue samples from 50 patients with hepatic metastasis from colorectal carcinoma and used them for Tissue Microarray (TMA) construction. Representative tumor regions from biopsies of both the primary tumor and the metastasis were identified by a pathologist on hematoxylin and eosin-stained tissue sections. After pathologist review, TMAs were assembled from triplicate 0.6 mm cores of FFPE biopsy tumor samples using a TMA workstation MTA-1 (Beecher Instruments). All the immunohistochemical techniques were performed in the Surgical Pathology Department at Fundación Jiménez Díaz. Antigen retrieval was performed in PT-Link (Dako) for 20 minutes at 95 °C in high pH buffered solution (Dako). Endogenous peroxidase was blocked, by immersing the sections in 0.03% hydrogen peroxide for 5 minutes. Slides were washed for 5 minutes with Tris buffered saline solution containing Tween 20 at pH 7.6 and incubated with the primary antibodies anti-CPEB4 (Santa Cruz Technologies) for 20 minutes at room temperature, followed by incubation with the appropriate anti-Ig horseradish peroxidase-conjugated polymer (EnVision, Dako) to detect antigen-antibody. Sections were then visualized with 3, 3'-diaminobenzidine as a chromogen for 5 minutes and counterstained with hematoxylin. All immunohistochemical stains were performed in a Dako Autostainer. CPEB4 was expressed in the cytoplasm of the tumor cells and expression was scored independently by two pathologists

(MJFA and CDA) blinded to the outcome of the patients. In all the cases the intensity of the immunohistochemical expression was graded as weak, moderate or intense (1, 2 or 3, respectively) and this value was multiplied by the percentage of cells to obtain a z score with values ranging from 0-300. The cut-off point 150 was selected to divide cases with low CPEB4 expression ( $\leq 150$ ) or high expression ( $> 150$ ) (Figures 1A and 1B).

Data were analyzed with SPSS for Windows 20.0 statistical package (IBM corporation). Association between CPEB4 expression and clinicopathological and outcome variables were evaluated by chi-squared (or Fisher's exact test) or Student's t test for mean comparison, as indicated. For survival analysis we compared the Kaplan-Meier curves with the log-rank test. We also performed Cox's multivariate analysis of survival. The level of statistical significance was defined as a p value less than 0.05, except in multivariate survival analysis, in which  $p < 0.1$  is usually employed for model construction.

Permission for this study was obtained by the Ethical Committee on Scientific Investigation of our hospital. This study is in accordance to national regulations regarding personal data protection.

## Results:

Inclusion criteria for the present study were met by 50 patients. Overall 54% were male and the mean age was 62.3. Most tumors affected the sigmoid colon or the rectum (66%). As for local stage, most tumors were T3 (80%) and 50% of the cases were N0. Metastasectomy was performed in 41.3% of the cases and hepatectomy in the rest. Most metastasis involved the right liver (81.2%). The median number of metastatic nodules operated was 1 (mean: 1.7; range 1-5) and the mean size was 1.3 cm (0.4-5)

Table 1 summarizes the features of the tumors, according to CPEB4 expression. It can be noted that no feature was significantly associated with CPEB4 expression in our series. The type of resection and the number and size of the tumor nodules were not significantly different between both groups. We found no significant difference in immunohistochemical CPEB4 expression between primary and metastatic tumor.

Figure 2 shows the Kaplan-Meier curves for progression free survival and overall survival. Patients with high expression of CPEB4 in the primary tumor show a significantly worse prognosis both in terms of PFS and OS. The median PFS for patients with low CPEB4 expression was 25 months in contrast with 15 months for patients with high expression ( $p =$

0.03). The median OS was 62 and 29 for both groups, respectively (p values = 0.01). Most patients in our series showed hepatic recurrence and died due to hepatic disease progression.

Table 2 summarizes the results of Cox multivariate analysis. For OS, CPEB4 expression showed independent prognostic value, but T stage and mucin production remained in the model with a trend toward significance (p values 0.05-0.1). For PFS only CPEB4 expression showed independent prognostic value and inflammatory reaction had a trend toward significance. CPEB4 high expression is associated with a 3.3 higher risk of death of disease and 2.1 higher risk of disease progression, independently of other variables.

### **Discussion:**

Despite recent advances in therapy, stage IV colorectal carcinoma is still associated with a bad outcome.<sup>2</sup> Chemotherapy and subsequent complete resection is the standard therapeutic scheme for these patients, but unluckily progression is the rule and most patients eventually succumb to disease. There is a clear need to find factors involved in the progression of colorectal carcinoma and also predictors of therapy response, that can guide selection of adjuvant therapy in these complex cases, mainly with targeted drugs. In this sense some reports have tried to predict the recurrence risk of patients with resected metastasis from colon carcinoma, even establishing predictive algorithms.<sup>11,12</sup>

Most reports regarding CPEB proteins roles are experimental and few reports have analysed the potential prognostic role of CPEB4 expression in series of human cancer cases.<sup>13,14</sup> A report by Sun et al.<sup>14</sup> has recently described a significant association between high CPEB4 expression and prognosis in breast carcinoma and also gliomas.<sup>15,16</sup> It might seem CPEB4 is always associated to aggressiveness in human tumors, but experimental work in knock-out mice reveals that CPEB4 can be downregulated during hepatocellular carcinoma progression and this speaks of a rather complex involvement in cancer development, that can depend specifically on the tissue.<sup>6</sup>

To the best of our knowledge there are no previous reports on the prognostic role of CPEB4 expression in human colorectal carcinomas. Only one previous experimental work by Zhong et al. has analysed the miRNA-203 mediated dysregulation of CPEB4 expression, showing involvement of this protein in apoptosis and proliferation in vitro.<sup>10</sup> Specifically, CPEB4 knock-out mice have a reduced expression of anti-apoptotic molecules, like BCL-XL, and an increase of BAX. Although these authors suggested CPEB4 might influence prognosis in human cancer, they did not perform any follow-up clinical study, like ours. We have chosen stage IV

patients because they have a rather uniform bad prognosis, receive a standardized therapy in our Hospital and it would be very important to define prognostic markers, that help adjuvant therapy selection. In this sense CPEB4 is a very interesting molecule, as there are targeted drugs against it which have been tried with some success in hepatic cirrhosis.

The present study has several drawbacks, which deserve to be mentioned. The most important one is the small number of cases and the retrospective nature. It seems clear prospective adequately powered studies are necessary to settle this matter.

In summary we conclude that CPEB4 seems a promising target for future therapies in metastatic colorectal carcinoma. However, furthermore prospective studies should be done to confirm these preliminary findings.

## References:

1. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 212-36.
2. Ribero D, Wang H, Donadon M, et al. Bevacizumab improves pathologic response and protects against hepatic injury in patients treated with oxaliplatin-based chemotherapy for colorectal liver metastases. *Cancer* 2007; 110: 2761-7.
3. Pawlik TM, Scoggins CR, Zorzi D, et al. Effect of surgical margin status on survival and site of recurrence after hepatic resection for colorectal metastases. *Ann Surg* 2005; 241: 715-22.
4. Benoist S, Brouquet A, Penna C, et al. Complete response of colorectal liver metastases after chemotherapy: Does it mean cure? *J Clin Oncol* 2006; 24: 3939-45.
5. Minagawa M, Yamamoto J, Kosuge T, et al. Simplified staging system for predicting the prognosis of patients with resectable liver metastasis: Development and validation. *Arch Surg* 2007; 142: 269-76.
6. Kan MC, Oruganty-Das A, Cooper-Morgan A, et al. CPEB4 is a cell survival protein retained in the nucleus upon ischemia or endoplasmic reticulum calcium depletion *Mol and Cell Biol* 2010; 30: 5658-71.
7. Calderone V, Gallego J, Fdez-Miranda G et al. Sequential Functions of CPEB1 and CPEB4 Regulate Pathologic Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in Chronic Liver Disease. *Gastroenterology*. 2016; 150: 982-97.
8. Hu H, Cong L, Liang C, et al. Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 4 is highly expressed in human glioma. *Neuroreport*. 2016; 27: 593-9.
9. Tsai LY, Chang YW, Lee MC, et al. Biphasic and Stage-Associated Expression of CPEB4 in Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One*. 2016 May 9;11(5):e0155025. doi: 10.1371/journal.pone.0155025.
10. Zhong X, Xiao Y, Chen C, et al. MicroRNA-203-mediated posttranscriptional deregulation of CPEB4 contributes to colorectal cancer progression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015; 466: 206-13.
11. Fong Y, Fortner J, Sun RL, et al. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: Analysis of 1001 consecutive cases. *Ann Surg* 1999; 230:309-18.

12. Malik HZ, Prasad KR, Halazun KJ, et al. Preoperative prognostic score for predicting survival after hepatic resection for colorectal liver metastases *Ann Surg* 2007; 246: 806-14.
13. Wu YY, Hwang YT, Perng WC; et al. CPEB4 and IRF4 expression in peripheral mononuclear cells are potential prognostic factors for advanced lung cancer. *J Formos Med Assoc.* 2016 Apr 21. pii: S0929-6646(16)00050-4. doi: 0.1016/j.jfma.2016.01.009.
14. Sun HT, Wen X, Han T; et al. Expression of CPEB4 in invasive ductal breast carcinoma and its prognostic significance. *Onco Targets Ther.* 2015 Nov 26;8:3499-506. doi: 10.2147/OTT.S87587.
15. Hu W, Yang Y, Xi S, et al. Expression of CPEB4 in Human Glioma and Its Correlations With Prognosis *Medicine (Baltimore)*. 2015 Jul;94(27):e979. doi: 10.1097/MD.0000000000000979.
16. Boustani MR, Mehrabi F, Yahaghi E et al. Somatic CPEB4 and CPEB1 genes mutations spectrum on the prognostic predictive accuracy in patients with high-grade glioma and their clinical significance. *J Neurol Sci.* 2016 Apr 15;363:80-3. doi: 10.1016/j.jns.2016.02.032. Epub 2016 Feb
17. D'Anzeo M, Faloppi L, Scartozzi M The role of micro-RNA in hepatocellular carcinoma: from molecular biology to treatment. *Molecules* 2014; 19: 6393-406.

**Figure legends:**

Figure 1: A. High power image of a colon carcinoma showing intense positivity for CPEB4. Note cytoplasmic positivity in epithelial tumor cells and also in some stromal and endothelial cells.

B. High power image of a colon carcinoma negative for CPEB4. Note endothelial cells stained as positive internal control. (Both images stained for CPEB4, x 400)

Figure 2: Kaplan-Meier survival curves, for PFS and OS.

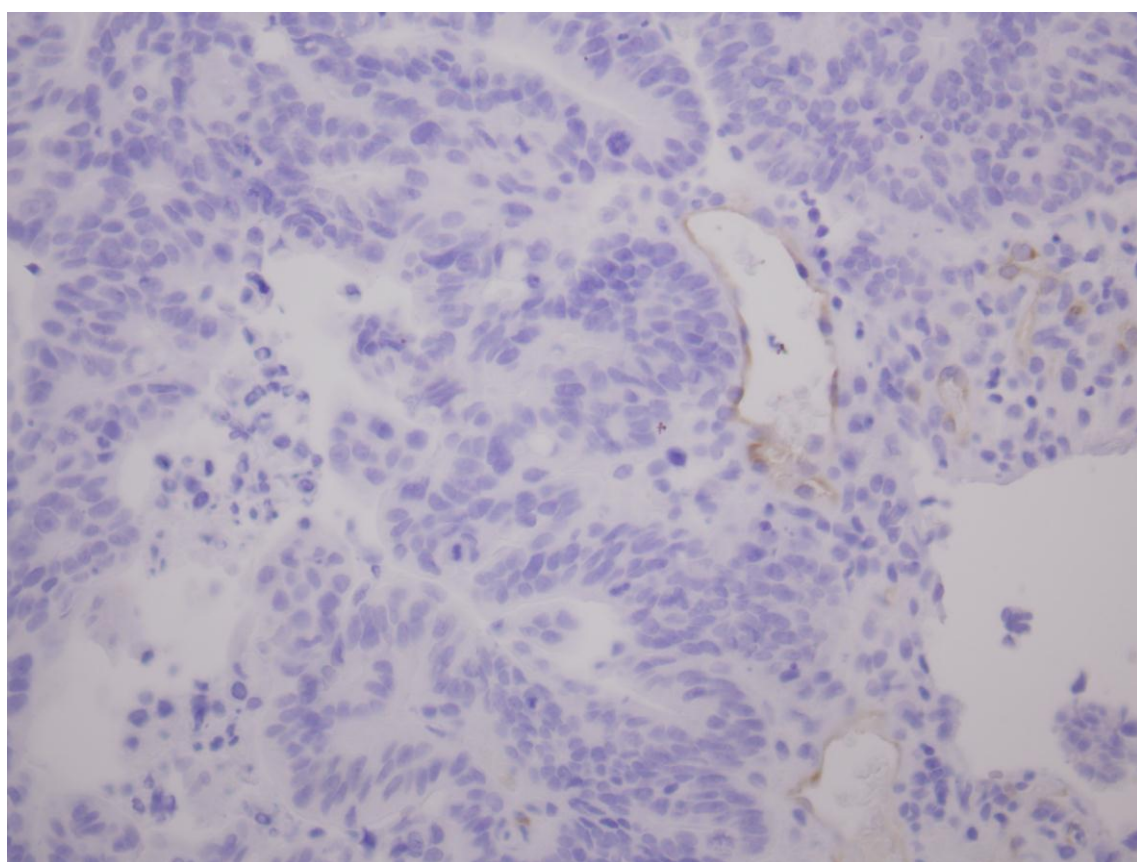
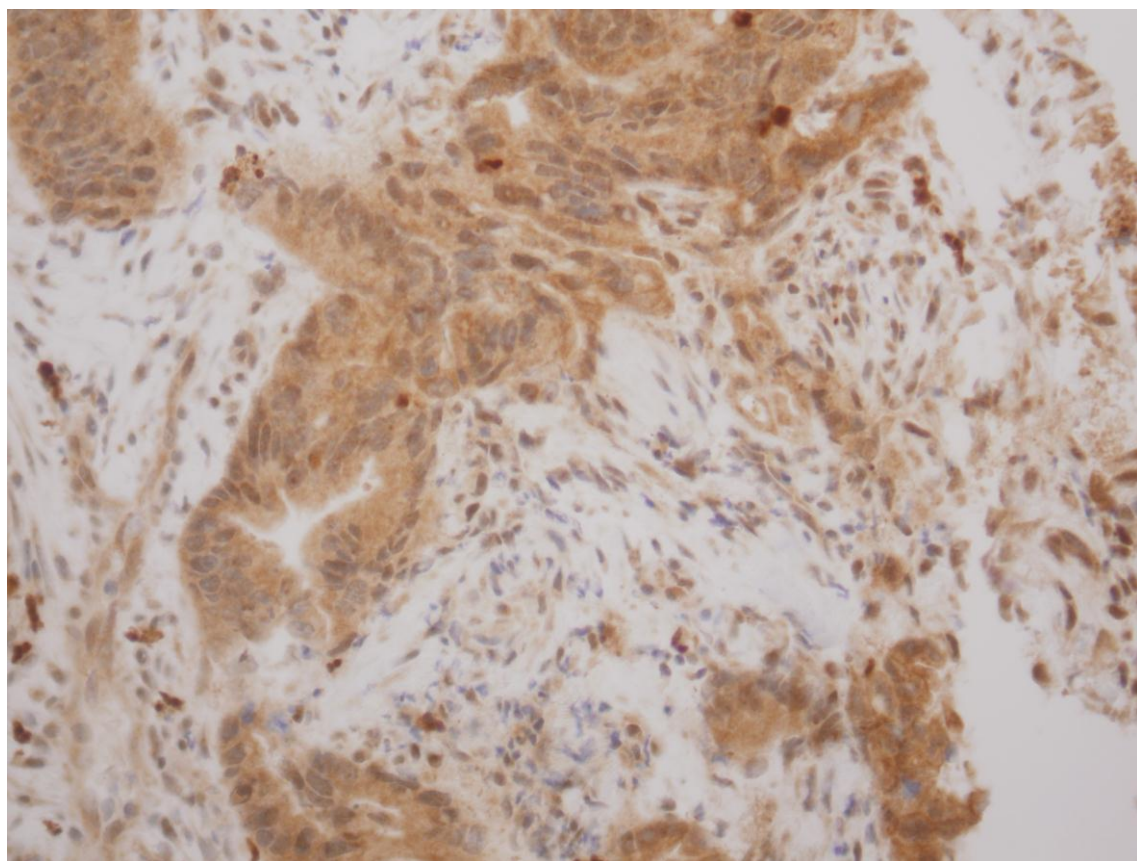
Table 1: Features of the cases according to CPEB4 expression

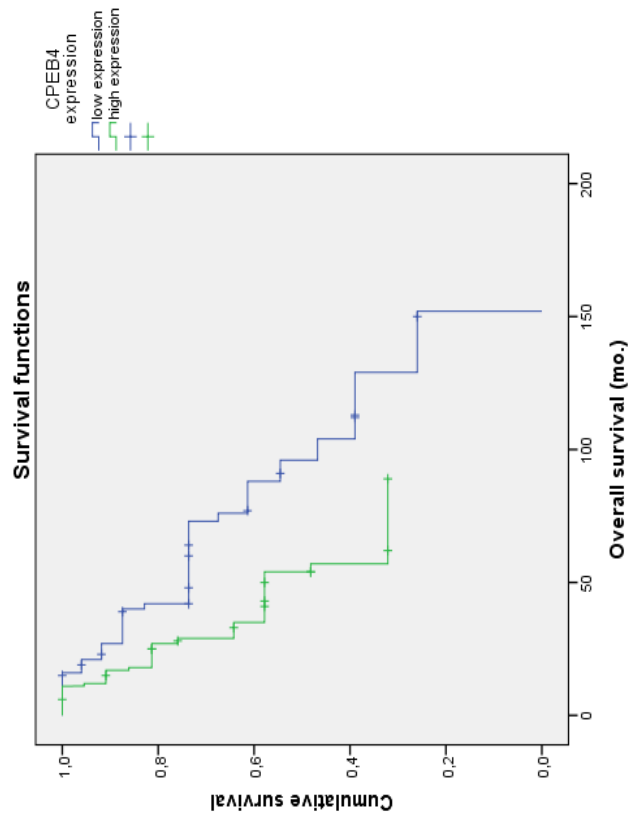
		Low CPEB4 expression	High CPEB4 expression		p value for the comparison
Gender	Male	17 (63%)	10 (43.5%)		0.16
	Female	10 (37%)	13 (66.5%)		
Differentiation	Low grade	19 (70.4%)	14 (60.9%)		0.58
	High grade	8 (29.6%)	9 (39.1%)		
Location	Colon	7 (36%)	10 (43.5%)		0.19
	Sigmoid- rectum	20 (64%)	13 (56.5%)		
Lymph vessel invasion	Present	7 (28%)	2 (9.1%)		0.14
	Absent	18 (72%)	20 (90.9%)		
Lymphohistiocytic Inflammatory reaction	Absent	13 (52%)	13 (59%)		0.6
	Scarce	7 (28%)	3 (13.6%)		
	Intense	5 (20%)	6 (27.4%)		
Leading front	Pushing	10 (40%)	4 (18.2%)		0.1
	Infiltrative	15 (60%)	18 (81.8%)		
Desmoplasia	Absent	24 (96%)	16 (72.7%)		0.15
	Present	1 (4%)	6 (27.3%)		
Mucin production	Absent	22 (88%)	19 (86.4%)		0.5
	Present	3 (12%)	3 (13.6%)		
pT stage	T1	1 (3.7%)	0 (0%)		0.4
	T2	2 (7.4%)	3 (13%)		
	T3	23 (85.2%)	17 (73.9%)		
	T4	1 (3.7%)	3 (13%)		
pN stage	N0	15 (63%)	8 (34.8%)		0.12
	N1	5 (18.5%)	10 (43.5%)		
	N2	5 (18.5%)	5 (21.7%)		



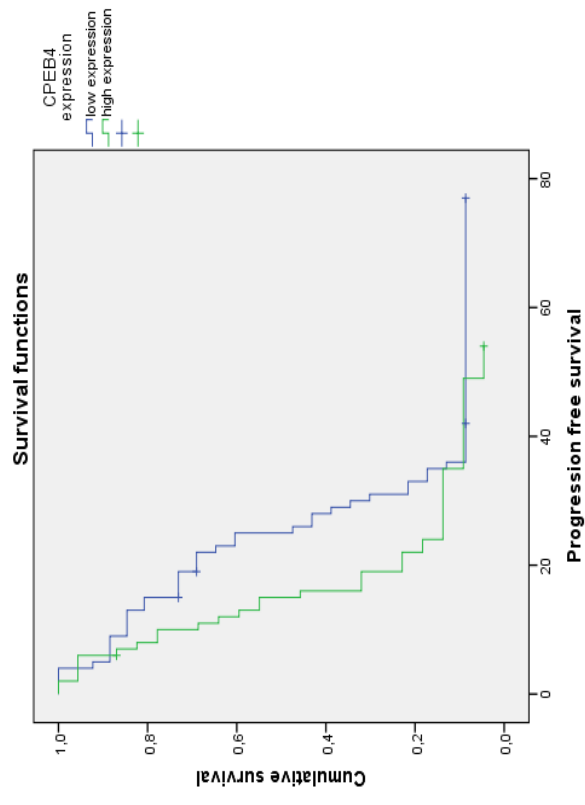
Table 2. Cox multivariate analysis of survival

	Variables with independent prognostic value	Hazard ratio (95% Confidence interval)	p value
PFS	Inflammatory reaction	0.75 (0.5-1)	0.09
	CPEB4 expression	2.1 (1.1-4.15)	0.023
OS	T stage	4.4 (0.95-20)	0.06
	Mucin	0.18 (0.02-1.3)	0.09
	CPEB4 expression	3.3 (1.1-10.3)	0.03





$p = 0,05$



$p = 0,017$